

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

FYZIKÁLNĚ CHEMICKÉ VLASTNOSTI NOVĚ  
PŘIPRAVENÝCH LÉČIV

Physico-chemical Properties of Newly Synthesized  
Drugs

Diplomová práce

Diploma thesis

Vedoucí diplomové práce: Ing. Vladimír Kubíček, CSc.

Hradec Králové 2012

Šarlota Krčilová

**Prohlášení:**

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Obrázky jsou použity se svolením autorů. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

5.5.2012

.....

### **Poděkování:**

Tímto bych chtěla vyjádřit poděkování svému školiteli Ing. Vladimíru Kubíčkovi, CSc. za odbornou pomoc a spolupráci při tvorbě mé diplomové práce.

## **Abstrakt:**

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

Kandidát: Šarlota Krčilová

Konzultant: Ing. Vladimír Kubíček, CSc.

Název diplomové práce: Fyzikálně chemické vlastnosti nově připravených léčiv

V této diplomové práci byly měřeny disociační konstanty nově připravených potenciálních léčiv na bázi kyseliny pyrazin-2-karboxylové. K měření byly vytipovány tři metody, jejichž instrumentace je dostupná na katedře biofyziky a fyzikální chemie; metoda potenciometrická, metoda spektrofotometrická v UV-VIS oblasti a metoda extrakční spektrofotometrie.

U všech látek se podařilo naměřit pK hodnoty potenciometricky, zatímco každá z optických metod byla úspěšná pouze jedenkrát. Není proto možné provést porovnání jednotlivých metod.

Správnost výsledků dosažených potenciometricky je dokumentována velmi dobrou shodou naměřené a literární hodnoty pK kyseliny pyrazin-2-karboxylové.

## **Abstract:**

Charles University in Prague  
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové  
Department of Biophysics and Physical Chemistry

Candidate: Šarlota Krčilová

Consultant: Ing. Vladimír Kubíček, CSc.

Title of Thesis: Physico-chemical Properties of Newly Synthesized Drugs

Dissociation constants of some newly synthesized drugs based on pyrazine-2-carboxylic acid were measured in this diploma thesis. Three methods, having a sufficient instrumental background in the Department of Biophysics and Physical Chemistry, were proposed for the measurement, i. e. potentiometric method, spectrophotometry in UV-VIS region method and extraction spectrophotometry method.

pK values of all studied substances were successfully determined by the potentiometric method, whilst each of the optic methods gave just one pK result. Hence a comparison of the three methods is not possible.

Accuracy of the potentiometric method results is documented by a very good agreement of the measured and literary pK values of pyrazine-2-carboxylic acid.

## **Obsah:**

1. ZADÁNÍ PRÁCE.....	5
2. TEORETICKÁ ČÁST .....	7
2.1 Pyrazin.....	8
2.1.1 Pyrazin-2-karboxylová kyselina.....	8
2.2 Potenciometrie .....	8
2.2.1 Stanovení ionizační konstanty potenciometrickou titrací pomocí skleněné elektrody.....	9
2.2.2 Příprava roztoků.....	11
2.2.3 Volba koncentrace pro titraci.....	11
2.2.4 Odvození a výběr z rovnic pro výpočet $pK$ .....	12
2.2.5 Obvyklé zdroje chyb a jejich odstranění .....	13
2.2.6 Chybné hodnoty konstant.....	14
2.2.7 Směsná rozpouštědla .....	14
2.3 Spektrofotometrie .....	15
2.3.1 Spektrofotometrické stanovení disociačních konstant.....	16
2.3.2 Pufry a roztoky.....	18
2.3.3 Příprava zásobního roztoku měřené látky.....	18
2.3.4 Hledání spekter ionizované a molekulární formy.....	18
2.3.5 Volba analytické vlnové délky .....	19
2.3.6 Předběžné stanovení přibližné $pK_a$ hodnoty.....	19
2.3.7 Přesné stanovení $pK_a$ hodnoty.....	19
2.3.8 Extrakční spektrofotometrie .....	19
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	21
3.1 Použité chemikálie .....	22
3.2 Použité přístroje.....	27
3.3 Příprava jednotlivých roztoků .....	28
3.4 Postup stanovení hodnot $pK$ .....	28

3.4.1 Potenciometrické stanovení .....	28
3.4.2 Spektrofotometrické stanovení.....	29
3.4.3 Extrakčně-spektrofotometrické stanovení .....	29
4. VÝSLEDKOVÁ ČÁST .....	30
4.1 pK P2K .....	32
4.2 pK MD 18/III.....	35
4.3 pK MD 1/III.....	41
4.4 pK MD 24/III.....	44
4.5 pK MD 5/III.....	48
4.6 pK MD 72/III.....	53
4.7 pK MD 74/III.....	58
4.8 pK MD X.....	62
5. DISKUZE.....	66
6. ZÁVĚR.....	70
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	72

## **1. ZADÁNÍ PRÁCE**



Hodnota  $pK$  je důležitým hlediskem pro posouzení síly kyselin a zásad. (Např. kyseliny s vyššími hodnotami  $pK$  jsou slabší, kdežto kyseliny s nižšími hodnotami  $pK$  jsou silnější.) Hodnota  $pK$ , společně s  $pH$  prostředí, ovlivňuje stupeň ionizace léčiv, který je rozhodující pro prostup léčiva přes biologické membrány. Těmito membránami prostupují pouze látky v neionizované formě. Jelikož se  $pH$  prostředí nemění, můžeme propustnost přes membrány ovlivnit právě hodnotou disociační konstanty dané látky. V případě, že je hodnota  $pK$  totožná s  $pH$  prostředí, je léčivo z 50 % disociováno, což je výhodné jak pro průnik biologickými membránami, tak pro vlastní účinek léčiv, kdy je důležitá ionizovaná forma látky.

Cílem této diplomové práce bylo zjistit hodnoty disociačních konstant nových potenciálních léčiv ze skupiny derivátů pyrazinu připravených na katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy. Při zkoumání fyzikálně chemických vlastností nově nasyntetizovaných látek spolupracuje tato katedra s katedrou biofyziky a fyzikální chemie. Součástí práce je pokus o srovnání tří různých metod stanovení hodnoty  $pK$ ; metody potenciometrické, metody spektrofotometrické a metody extrakčně-spektrofotometrické.

## **2. TEORETICKÁ ČÁST**

## 2.1 Pyrazin

Pyrazin (se sumárním chemickým vzorcem  $C_4H_4N_2$ ) a jeho deriváty patří do významné skupiny sloučenin, jež obsahují dva heterocyklicky vázané, aromatické dusíky nahrazující v šestičlenném kruhu dva atomy uhlíku.

Pyraziny se mohou vyskytovat přirozeně (např. pteridin, fenazin) i jako součást xenobiotik. Z přirozených látek je to nejčastěji kyselina pyrazin-aspergilová (antibakteriální účinky) produkovaná druhem *Aspergillus species*. Fenazin má účinky antibiotické, diuretické a protinádorové.

Pyraziny využíváme při syntézách mnohých pesticidů, insekticidů, léků, barviv, drog, ale i aromatických látek a látek užívaných jako základní suroviny v průmyslu. Tyto látky bohužel toxicky znečišťují životní prostředí. Dostávají se do něho z různých splašků ze zemědělství, z průmyslových i farmaceutických odpadních vod.

Pyrazin a jeho deriváty můžeme nalézt i v některých potravinách (hrách, ječmen, brambory, káva a mnohých dalších).

Nejčastější metodou syntetické výroby pyrazinu je Staedel-Rugheimerova syntéza.

### 2.1.1 Pyrazin-2-karboxylová kyselina

Pyrazin-2-karboxylová kyselina je metabolitem pyrazinamidu. Molekulová hmotnost této látky je 124,099 g/mol. Molekulární vzorec této kyseliny je  $C_5H_4N_2O_2$ .

## 2.2 Potenciometrie

„Potenciometrie je elektrochemická analytická metoda založená na měření rovnovážného napětí (elektromotorického napětí) článku, který je složen z měrné (indikační) a srovnávací (referentní) elektrody [1].“

### 2.2.1 Stanovení ionizační konstanty potenciometrickou titrací pomocí skleněné elektrody

Potenciometrie je nejčastěji používanou metodou pro stanovení ionizačních konstant. Historicky významná je pro toto stanovení vodíková elektroda, na níž je vodík vratně přeměňován na vodíkové ionty (díky jemně rozmělněné amorfní platině, která je součástí elektrody).

Reakce na elektrodě:



probíhá až do ustanovení rovnováhy. Výslednou hodnotu spočítáme dle vzorce:

$$E = - (RT/F) \times \ln \{H^+\}, \quad (2)$$

kde  $T$  značí absolutní teplotu,  $R$  univerzální plynovou konstantu a  $F$  Faradayovu konstantu.

Dnes se vodíkové elektrody používají zřídka. Je to především proto, že dnes již nevyhovují a jsou snadno zničitelné – snadno nevratně inaktivovatelné. Také velice často mohou katalytickou hydrogenací chemicky změnit měřenou látku.

Pro laboratorní měření pH hodnot se v současnosti používají téměř výhradně skleněné elektrody. Skleněná elektroda je tvořena tenkostěnnou baňkou vyrobenou z měkkého skla speciálně pro toto použití. V roli elektrody srovnávací se v naprosté většině případů setkáváme s elektrodou argentochloridovou, výjimečně, u některých speciálních měření, s elektrodou kalomelovou. Ke správnému určení pH hodnot je důležité použití vhodných elektrod a je třeba zaručit konstantní teplotu měření.

Vztah mezi potenciálem skleněné elektrody a pH roztoku vyplývá z rovnice:

$$-\log\{H^+\} = \text{pH} = (EMN - E_{\text{srov}})/0,0592 \quad \text{při teplotě } 25^\circ\text{C}, \quad (3)$$

zahrnuje i podmínky, jež mohou prostřednictvím asymetrie změnit potenciály i ostatní proměnné. Symbol *EMN* značí naměřené elektromotorické napětí článku. Symbol  $E_{\text{srov}}$  značí potenciál srovnávací elektrody.

Dnes je na trhu velká škála skleněných elektrod. Zásadní věcí pro použití skleněné elektrody je správná příprava elektrody před prvním měřením. K tomu je třeba, aby se na povrchu skleněné membrány vytvořila gelová difuzní vrstva. Toho se dosáhne ponořením nové elektrody do vhodného roztoku udaného výrobcem. V laboratorní praxi se tento proces nazývá „rozmáčení elektrody“. Potřebná doba rozmáčení je rovněž stanovena výrobcem, bývá to jeden nebo více dní. Tím je zajištěna reprodukovatelnost elektrodového potenciálu.

Před zahájením titrace musí být elektrody standardizovány dle pokynů výrobce pH-metru. K tomu se používají referenční roztoky – pufrů. Hodnota pH referenčního roztoku by měla být podobná hodnotě pH roztoku v baňce skleněné elektrody. Např. pro pH 7 je vhodný fosfátový pufr s hodnotou pH 6,86 (při 25 °C). Dále elektrodu ponoříme do referenčního roztoku ftalátu (při 25 °C; úprava na pH 4,00) a následně opět do fosfátového pufru. Tento postup se doporučuje nejméně jednou zopakovat. Tímto postupem je elektroda připravena pro měření v kyselé oblasti. Pro měření v zásadité oblasti se ftalátový pufr nahradí borátovým (při 25 °C; úprava na pH 9,18). Pro velmi přesná měření se provádí takzvaná tříbodová kalibrace za použití všech tří zmíněných pufrů.

Pokud skleněnou elektrodu nepoužíváme, ponoříme ji do uchovávacího roztoku podle pokynů výrobce. Uchovávacím roztokem bývá neutrální pufr o vhodné iontové síle.

Tempo ustanovení rovnováhy (při teplotě v rozsahu 20-25 °C) závisí na tloušťce skla tvořícího membránu, jeho množství a typu. Ustanovení je pomalejší u miniaturizovaných elektrod a u elektrod vysoce odolných. Celková doba ustanovení rovnováhy mezi hodnotami pH 4 až 9,2 nesmí trvat déle než 8 minut (při téže teplotě roztoku). Při teplotách pod 15 °C se odolnost membrány zvyšuje (tzn. snižuje se rychlost ustanovení rovnováhy). Avšak za běžných laboratorních teplot bývá ustavení rovnováhy obvykle velmi rychlé.

Pro titraci se obvykle používají kádinky o objemu 50 nebo 100 mililitrů. Pro správnost výsledků je důležité, aby elektroda byla dostatečně ponořena v roztoku. To znamená, že je třeba dbát, aby celá skleněná membrána byla ponořena do měřeného

roztoku. V případě, že se používá kombinovaná elektroda, je nutné, aby byla v měřeném roztoku ponořena rovněž diafragma srovnávací elektrody.

U velmi přesných měření je míchání zajištěno pomalým proudem dusíku, který je zaváděn pod hladinou roztoku. Během odečítání hodnot je třeba tok dusíku zastavit. Před použitím dusík vyčistíme probubláním Fieserovým roztokem (dithioničitan sodný, hydroxid sodný, anthrachinon-2-sulfonát sodný a voda) a vodou.

Celkový objem roztoku je malý, stejně jako přidávané množství kyseliny či zásady. Teplota se nesmí během měření měnit (optimální teplota je 20 nebo 25 °C). Měření nesmí rušit ani průvan, vysoká relativní vlhkost či sluneční osvit [2, 3].

### ***2.2.2 Příprava roztoků***

Je-li titrantem alkálie (hydroxid draselný či sodný), jsou její roztoky vodnými roztoky připravenými ve vodě prosté oxidu uhličitého. Voda prostá kyslíku je vhodná pro titrace snadno oxidujících látek. Ke snadnějšímu rozpouštění látek se využívá magnetické míchadélko vystavené stálému magnetickému toku. Elektrody nevkládáme do nádoby dříve, než se veškerá látka rozpustí. Míchání pomocí magnetického míchadélka je nejlepší alternativou zavádění plynného dusíku.

Rychlost a snadnost rozpouštění podporuje zvýšená teplota. Po rozpouštění látky upravíme teplotu na výchozí hodnotu a ponecháme ji ustálit [4]. Je vhodné provádět měření v termostatované nádobce.

### ***2.2.3 Volba koncentrace pro titraci***

Doporučená koncentrace je 0,01 mol/l. Při této koncentraci bývá vliv aktivitních koeficientů velmi malý. To již neplatí pro koncentrace desetkrát větší, tj 0,10 mol/l, kde je nutné s aktivitními koeficienty počítat. V některých případech se doporučuje provádět měření všech roztoků při téže iontové síle, které se dosáhne přidávkou chloridu draselného. Pak je ovšem třeba počítat s aktivitními koeficienty.

Potenciometrii je vhodné používat do hodnot  $pK_a$  11. Pro vyšší hodnoty  $pK_a$  je vhodnější využití spektrofotometrie.

### 2.2.4 Odvození a výběr z rovnic pro výpočet pK

Leží-li pH hodnoty během titrace 0,01 mol/l roztokem mezi 4 a 10, pro výpočet postačí použít jednoduchých vzorců.

$$[A^-] + [OH^-] = [K^+] + [H^+] \quad (4)$$

$$[A^-] = [KOH] - [OH^-] + [H^+] \quad (5)$$

Protože všechny soli jsou zcela ionizované,  $[K^+]$  je rovno koncentraci hydroxidu draselného.  $[C_0]$  je celková koncentrace kyseliny, která je přítomna ve dvou formách -  $A^-$  a HA. Tedy platí:

$$[C_0] = [A^-] + [HA] \quad (6)$$

Spojením vzorce 5 a 6 dostaneme novou rovnici:

$$[HA] = [C_0] - [KOH] - [OH^-] + [H^+] \quad (7)$$

$[KOH]$  v rovnicích značí koncentraci roztoku alkalického hydroxidu, kterou získáme, pokud v roztoku nebudou žádné příměsi.

Odtud získáme následující rovnosti:

$$[A^-] = [KOH] - [OH^-] \quad \text{pro alkalickou oblast} \quad (8)$$

$$[A^-] = [KOH] + [H^+] \quad \text{pro kyselou oblast} \quad (9)$$

$$[HA] = [C_0] - [KOH] + [OH^-] \quad \text{pro alkalickou oblast} \quad (10)$$

Zahrnutím koncentrací hydroxylových a vodíkových iontů do výpočtu se dosáhne nejspokojivějšího zpřesnění výsledků.

Obdobné rovnice platí i pro zásady. Leží-li výsledné hodnoty pK v rozmezí pH 4 až 10 (pro 0,01 mol/l roztok), můžeme koncentrace hydroxylových a vodíkových

iontů ve výpočtech zanedbat. To neplatí pro hodnoty pH nižší než 4 nebo vyšší než 10. Zde vodíkové ionty do výpočtu zahrneme.

### 2.2.5 Obvyklé zdroje chyb a jejich odstranění

V souboru hodnot  $pK_a$  je častou chybou jev vzestupného trendu v průběhu titrace (platí při titraci alkálií). Příčinou vzestupného trendu jsou nečistoty, které zkreslují množství stanovované látky. Nejběžnější a zároveň nejproblémovější nečistotou rušící stanovení je voda. Z tohoto důvodu je nutné, aby všechny stanovované látky byly čisté a vysušené za stejných podmínek. U navlhklých látek lze použít funkci  $Z$  jako součet čtyř známých koncentrací:

$$Z = [HCl] - [KOH] - [H^+] + [OH^-] \quad (11)$$

$$Z = C_0 - (1 / K_a^C) Z [H^+] \quad (12)$$

$$Z = C_0 - (Z / [H^+]) \quad (13)$$

Kde  $K_a^C$  značí disociační konstantu v koncentračním vyjádření.

Vzestupný trend je způsoben i dalšími jevy - nedostatečně rozpuštěná látka v roztoku ( $pK$  je nepřesné a nepoužitelné) nebo příliš rychlý proud dusíku. To samé platí i pro klesající trend při titraci kyselinou.

U některých látek dochází během titrace k jejich rozkladu. Několik prvních odečtů může vykazovat stejné či téměř totožné hodnoty  $pK_s$ , ale následně dojde k driftu potenciálu způsobenému rozkladem látky. Látky snadno podléhající rozkladu působením zásad či kyselin se často rozkládají jedinou kapkou titračního činidla i v dobře míchaných roztocích.

Při hodnotách pH 2 a nižších mohou být často získány chybné zásadité a kyselé konstanty. Někdy má daná látka skutečně zásadité či kyselé vlastnosti, ale rozptyl naměřených hodnot je příliš velký na to, aby mohl být získán přijatelný výsledek.



### 2.2.6 Chybné hodnoty konstant

Je-li hodnota  $pK_a$  výrazně nižší než logaritmus koncentrace měřeného roztoku, jde téměř jistě o chybnou konstantu a titrovaná látka v této oblasti nemá žádné zásadité či kyselé vlastnosti. Titrujeme-li čistou vodu (4,75 ml) kyselinou chlorovodíkovou (0,50 ml),  $pK_a$  má hodnotu přibližně 0,62 s absolutní chybou 0,72. Takto získaný výsledek se jeví jako absurdní.

Chybné (zásadité i kyselé) konstanty se objevují i při titraci se skleněnou elektrodou – při pH vyšším jak 11. Z tohoto důvodu je třeba hodnoty  $pK_a$  vybočující z rozmezí 2 až 11 vždy přijímat s opatrností.

### 2.2.7 Směsná rozpouštědla

Některé látky jsou sice velmi špatně rozpustné ve vodě, ale o to snadněji se rozpustí v těkavém rozpouštědle. V takovém případě je výhodné použít při stanovení disociační konstanty směs dvou rozpouštědel, například ethanolu a vody.

Bylo vypořádováno, že alkoholy snižují sílu bází i kyselin. Hall a Sprinkl (1932) [5] vynášeli křivky závislosti hodnot  $pK_a$  na koncentraci v rozmezí 97 % až 10 % ethanolu pro 18 aromatických a alifatických aminů. Křivky mají tvar hokejky a u jednotlivých aminů mají odlišné směrnice. Hall a Sprinkl přišli na to, že průměrné snížení  $pK_a$  u 50 % ethanolu je 0,54 a že nelze provést úspěšnou extrapolaci na 0 % ethanolu v případech, kdy aminy nejsou dostatečně rozpustné na to, aby se rozpustily v 10 % a 20 % ethanolu. Titrace za použití 50 % acetonu ukázala, že snížení  $pK_a$  je v tomto případě ještě větší a to o 1,5 až 2,5 jednotky [6]! Ještě větší snížení  $pK_a$  byla často pozorována u titrací v 50 % dioxinu.

Srovnávat sílu řady látek je možné i u látek chemicky nepříbuzných. Při použití ethanolu můžeme vypořádat určitou anomálii. Methylace v 0 % až v 35 % ethanolu zvyšuje zásaditou intenzitu, kdežto methylace v 50 % až v 65 % ethanolu ji snižuje. Směsí ethanolu a vody získáme podobné anomálie  $pK_a$  hodnot u azobarviv [7] a alifatických aminů. Podobné jevy se vyskytují i u zředěného 2-methoxyethanolu a dimethylformamidu.

Dvě chemicky příbuzné látky se mohou lišit v liposolibilitě. Zde platí závislost  $\Delta pK_a$  ( $\Delta pK_a$  = rozdíl mezi  $pK_a$  látky ve vodě a  $pK_a$  téže látky ve směsném rozpouštědle) na rozdělovacím koeficientu [8]:

$$\Delta pK_a = \log D_{H^+} + \log D_B - \log D_{BH^+}, \quad (14)$$

kde  $D_x$  znázorňuje distribuční koeficient látky X mezi dvě rozpouštědla.

Látky více lipofilní jsou obklopeny obalem molekul rozpouštědla s nízkou dielektrickou konstantou, ionty jsou obklopeny molekulami vody.

„Kyseliny se chovají podobně. Kyselina benzoová je ve vodě čtyřikrát silnější než kyselina octová, v 20% ethanolu už jenom dvaapůlkrát silnější a v 50% ethanolu mají kyseliny stejnou sílu [9].“

Abychom se vyhnuli extrapolaci křivky ohnuté do tvaru hokejky, použijeme lineární závislost [10]:

$$p_s K_a + \log [H_2O] \text{ proti } 1/D, \quad (15)$$

kde  $D$  je dielektrická konstanta, symbol  $p_s K_a$  je zdánlivá disociační konstanta v prostředí směsného rozpouštědla.

Takováto extrapolace je úspěšná, pokud obsah methanolu nepřesáhne 40 %.

Použitím spektrometrických stanovení či potenciometrických metod uzpůsobených k měření za nízkých koncentrací se lze vyhnout měřením ve směsných rozpouštědlech.

## 2.3 Spektrofotometrie

„Spektrofotometrie je stanovování vlastností vzorku, např. koncentrace určité látky v roztoku, na základě pohlcování světla v různých vlnových délkách spektra.

Pokud se měří jen při jedné vlnové délce, metoda se spíše označuje fotometrie.

Obdobně zařízení, která měří při jedné nebo jen několika přesně definovaných vlnových délkách monochromatického světla, označujeme jako fotometry. Technicky složitější a dokonalejší přístroje, které umožňují vlnovou délku monochromatického světla libovolně nastavit, nebo měřit část absorpčního spektra v určitém úseku vlnových délek, se nazývají spektrofotometry [11].“

### 2.3.1 Spektrofotometrické stanovení disociačních konstant

Spektrofotometrické stanovení disociačních konstant je časově náročnější než stanovení potenciometrické. Využití spektrofotometrie v oblasti viditelného a ultrafialového záření je výhodné pro příliš nízké a příliš vysoké hodnoty  $pK_a$  (tj. jsou-li nižší než 2 či vyšší než 11) nebo jsou-li látky špatně rozpustné. Spektrofotometrické stanovení odráží poměr neutrálních a ionizovaných molekul v řadě pufrů nepohlcujících záření. Nejprve získáme spektrum neionizované formy studované látky. Toto spektrum porovnáme se spektrem formy ionizované. Pro výpočet  $pK$  je vybrána ta vlnová délka, při níž je největší rozdíl absorbancí ionizované a neutrální formy. Tato vlnová délka se označuje jako „analytická vlnová délka“.

Při výpočtech platí zákon, že výsledná absorbance při určité vlnové délce je součtem dvou dílčích absorbancí: absorbance ionizovaných a absorbance neutrálních molekul.

$$A = A_I + A_M \quad (16)$$

Absorbance dílčích komponent souvisí s jejich molární koncentrací  $c$  podle Lambertova-Beerova zákona  $A = \varepsilon lc$ , kde  $\varepsilon$  značí molární absorpční koeficient dané komponenty,  $l$  optickou dráhu, tj. tloušťku kyvety.

Koncentrace ionizovaných molekul ve směsi je rovna  $F_I c$ , kde  $F_I$  značí frakci ionizace.

$$F_I = [A^-] / ([A^-] + [HA]) \quad \text{pro kyseliny} \quad (17)$$

Absorbance ionizovaných molekul ve směsi je rovna  $\varepsilon_I F_I c l$ , absorbance neutrálních molekul je rovna  $\varepsilon_M F_M c l$ .  $F_M$  značí frakci neutrálních molekul,  $\varepsilon_I$  a  $\varepsilon_M$  molární absorpční koeficienty ionizovaných a neutrálních molekul. Nahradíme-li výraz  $[HA]$  výrazem  $([H^+] \times [A^-] / K_a)$ , platí:

$$F_I = K_a / ([H^+] + K_a) \quad (18)$$

pro kyseliny

$$F_M = [H^+] / ([H^+] + K_a) \quad (19)$$

$$F_I = [H^+] / ([H^+] + K_a) \quad (20)$$

pro zásady

$$F_M = K_a / ([H^+] + K_a) \quad (21)$$

Je-li pro všechna měření použita stejná optická dráha (kyveta), pak platí:

$$A = (\varepsilon_I F_I + \varepsilon_M F_M) cl \quad (22)$$

Protože  $\varepsilon = A/cl$ , platí:

$$\varepsilon = \frac{\varepsilon_I K_a}{[H^+] + K_a} + \frac{\varepsilon_M [H^+]}{[H^+] + K_a} \quad \text{pro kyseliny (a)} \quad (23)$$

$$\varepsilon = \frac{\varepsilon_M K_a}{[H^+] + K_a} + \frac{\varepsilon_I [H^+]}{[H^+] + K_a} \quad \text{pro zásady (b)} \quad (24)$$

Použijeme-li pro všechna měření stejné celkové koncentrace, mohou být výsledné rovnice (a) a (b) zapsány s pomocí příslušných absorbancí namísto molárních absorpčních koeficientů.

Existují dvě formy rovnice – pro kyseliny a zásady.

$$pK_a = pH + \log \frac{A_I - A}{A - A_M} \quad \text{pro kyseliny} \quad (25)$$

$$pK_a = pH + \log \frac{A_M - A}{A - A_I} \quad \text{pro zásady} \quad (26)$$

### **2.3.2. Pufry a roztoky**

Pufry jsou vodné roztoky bránící změně pH při přidavku kyseliny nebo zásady či při zředění. Vhodné jsou pufry s malou absorbcí (např. kyselina chlorooctová, fosforečná či citrónová).

Vodné roztoky látek pro přípravu pufrů uchováváme při koncentraci 0,1 mol/l, před použitím je zředíme na 0,01 mol/l a upravíme pH (pomocí kyseliny chlorooctové nebo N-hydroxidu draselného). Roztoky neuchováváme v nádobách z polyethylenu, které uvolňují látky absorbující světlo.

Absorpce roztoků se mění se změnou pH. U pH hodnot nižších než 2,2 anebo vyšších než 11,6 použijeme namísto pufrů hydroxid sodný (draselný) či kyselinu chlorovodíkovou příslušné koncentrace. Voda má – při 25 °C – bazické  $pK_a$  rovno nule a kyselé přibližně 14. Proto voda vykazuje jistou pufrací kapacitu při pH nižším než 2 a vyšším než 12.

### **2.3.3 Příprava zásobního roztoku měřené látky**

Zásobní roztoky obvykle připravujeme o koncentraci  $5 \times 10^{-4}$  mol/l. V případě problémů s rozpustností se kyselé sloučeniny snadněji rozpustí v 0,005mol/l hydroxidu draselném (předpokládané  $pK_a$  je nižší než 10), zásadité sloučeniny v 0,005mol/l kyselině chlorovodíkové (předpokládané  $pK_a$  je vyšší než 4).

### **2.3.4 Hledání spekter ionizované a molekulární formy**

U neznámých kyselin jsou požadována dvě spektra – molekulové a aniontové. Zásobní roztok má koncentraci  $10^{-4}$  mol/l v 0,01mol/l hydroxidu draselném (pH = 12) a v 0,01mol/l kyselině chlorovodíkové (pH = 2). Absorbanci proměříme v celém rozsahu – tj. od pH 2 po pH 12. Spektrum získané v roztoku hydroxidu draselného je aniontové, spektrum v roztoku kyseliny chlorovodíkové je molekulové. Pokud spektrum není čisté, proměříme neznámou kyselinu znova. Při opakovaném měření použijeme 0,1mol/l hydroxid draselný (pH = 13) a 0,1mol/l kyselinu chlorovodíkovou (pH = 1). Obě spektra jsou obvykle odlišná. Jen ve výjimečných případech je molekulové spektrum totožné se spektrem aniontovým. [12]

U měřených zásaditých vzorků jsou požadována také dvě spektra. Spektrum získané v roztoku hydroxidu draselného je molekulové, spektrum v roztoku kyseliny chlorovodíkové je kationtové. Postup je obdobný jako u neznámých kyselých vzorků.

### ***2.3.5 Volba analytické vlnové délky***

Neexistuje univerzální vlnová délka. Vlnovou délku nastavíme dle očekávané absorpce látky. Při vhodně zvolené vlnové délce absorbuje jedna forma maximálně, ostatní vůbec.

### ***2.3.6 Předběžné stanovení přibližné $pK_a$ hodnoty***

Pomocí připraveného zásobního roztoku stanovíme předběžnou hodnotu  $pK_a$ . K tomu použijeme pufr s vhodným pH, tj. takovým, aby v něm neznámá látka byla ionizována pouze z části. Hodnotu  $pK$  vypočteme z příslušné rovnice (25 nebo 26).

### ***2.3.7 Přesné stanovení $pK_a$ hodnoty***

K přesnému stanovení  $pK_a$  hodnot využijeme předběžně stanovenou hodnotu  $pK_a$ . Vybereme řadu sedmi pufrů, jejichž pH vychází z předběžně stanovené hodnoty  $pK_a$ . Proměřením spektra získáme sedm  $pK$  hodnot. Z průměru těchto hodnot dostaneme výsledné  $pK_a$ . Jednotlivé hodnoty by se neměly lišit o více jak 0,06 jednotky.

### ***2.3.8 Extrakční spektrofotometrie***

Extrakčně-spektrofotometrická stanovení nevyužíváme jenom v analýze léčiv (obecně nízkomolekulárních látek), ale třeba i při stanovení bílkovin. Stanovení organických kationtů, resp. aniontů, spočívá v tvorbě asociátů definovaného složení (většinou iontových párů) s anionty, resp. kationty vhodně zvolených bazických či kyselých barviv ve vodném prostředí. Ionty vytřepeme z vodné fáze do organické fáze (nemísící se s vodou). Při vytřepávání zvolíme vhodné pH, které zaručí, že stanovovaná látka i barvivo jsou ve vodném prostředí zcela ionizovány. Do organické fáze přejde jen určité množství barevného protiiontu. Toto množství je (při dodržení určitých

podmínek) úměrné stanovované látky. Takto celkem snadno stanovíme koncentraci dané látky.

Dnes používaný jednoduchý a rychlý postup [13] umožňuje stanovit koncentraci i více látek současně za stejných podmínek. Stanovení provádíme ve zkumavkách, které poté necháme protřepat na třepačce a dále ponecháme jednotlivé vrstvy ve svislé poloze dostatečnou dobu (obvykle 10 – 15 minut) separovat. Nakonec proměříme absorbanci organické vrstvy pomocí spektrofotometru. Při měření dodržujeme určité podmínky - vhodné barvivo a jeho koncentraci ve vodě, vhodné pH a druh pufru, teplotu, stupeň čistoty chloroformu, vhodné zkumavky, těsnost uzavření a délku třepání.

Tuto metodu lze použít i ke stanovení pK. Stanovení spočívá v naměření závislosti absorbance chloroformového výtřepku na použitém pH vodné fáze. Tato tzv. A-pH křivka má esovitý průběh a pK se určí jako hodnota pH inflexního bodu na této křivce [14].

### **3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**



### 3.1 Použité chemikálie

Základní údaje o použitých derivátech kyseliny pyrazin-2-karboxylové jsou uvedeny v následující tabulce:

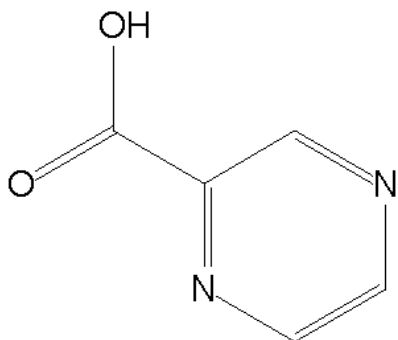
Tab. 1 : Přehled použitých derivátů kyseliny pyrazin-2-karboxylové.

Systematický název	Označení v pokusech	M (g/mol)	Molekulární vzorec
kyselina pyrazin-2-karboxylová	P2K	124,099	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
6-chloropyrazin-2-karboxylová kyselina	MD 1/III	157,99	C <sub>5</sub> H <sub>3</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
5- <i>terc</i> -butyl-6-chlorpyrazin-2- karboxylová kyselina	MD 24/III	214,05	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
6-( <i>m</i> -tolylamino)pyrazin-2- karboxylová kyselina	MD 18/III	229,09	C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>
5-(2-hydroxybenzoyl)pyrazin-2- karboxylová kyselina	MD 5/III	244,05	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>
6-((4-methoxyfenyl)thio)pyrazin- 2-karboxylová kyselina	MD 72/III	262,04	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S
6-((3-methoxyfenyl)thio)pyrazin- 2-karboxylová kyselina	MD 74/III	262,04	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S
3-aminopyrazin-2-karboxylová	MD X	244,05	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>

V práci byly dále použity tyto chemikálie:

- Deionizovaná voda čištěná reverzní osmózou
- Denaturovaný líh (lihovar Hlinsko)
- Kyselina chlorovodíková p. a. (Lachema n.p. Brno, závod Neratovice)
- Hydroxid sodný p. a. (Lachema n.p. Brno, závod Neratovice)
- Kyselina boritá (Lachema a.s. Neratovice)
- Kyselina fosforečná (Lachema n.p. Brno, o.z. Neratovice)
- Kyselina octová (Lachema a.s. Neratovice)
- Methylalkohol p. a. (Penta)
- Tetrapentylamoniumbromid zrum (Fluka)
- Chloroform (Lachema n.p. Brno, o.z. Neratovice)

Struktura kyseliny pyrazin-2-karboxylové a jejích použitých derivátů jsou znázorněny na následujících obrázcích.

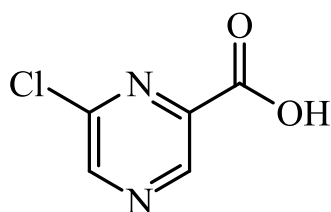


Obr. 1 : Struktura kyseliny pyrazin-2-karboxylové (P2K)

6-chloropyrazine-2-carboxylic acid

Log P: 0,24

CLogP: 0.828948



Chemical Formula: C<sub>5</sub>H<sub>3</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

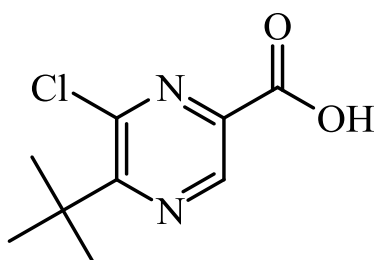
Exact Mass: 157,99

Obr. 2 : Struktura 6-chloropyrazin-2-karboxylová kyseliny (MD 1/III)

5-*tert*-butyl-6-chloropyrazine-2-carboxylic acid

Log P: 2,37

CLogP: 2.65495



Chemical Formula: C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

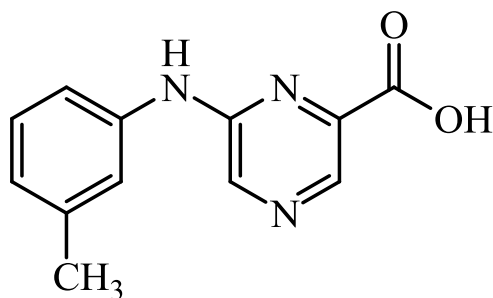
Exact Mass: 214,05

Obr.3 : Struktura 5-*terc*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylová kyseliny (MD 24/III)

6-(*m*-tolylamino)pyrazine-2-carboxylic acid

Log P: 2,01

CLogP: 3.40089



Chemical Formula: C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

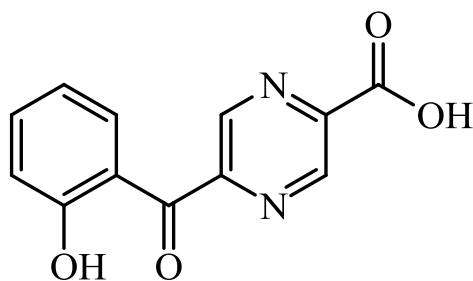
Exact Mass: 229,09

Obr. 4 : Struktura 6-(*m*-tolylamino)pyrazin-2-karboxylová kyseliny (MD 18/III)

5-(2-hydroxybenzoyl)pyrazine-2-carboxylic acid

Log P: 0,58

CLogP: 1.98497

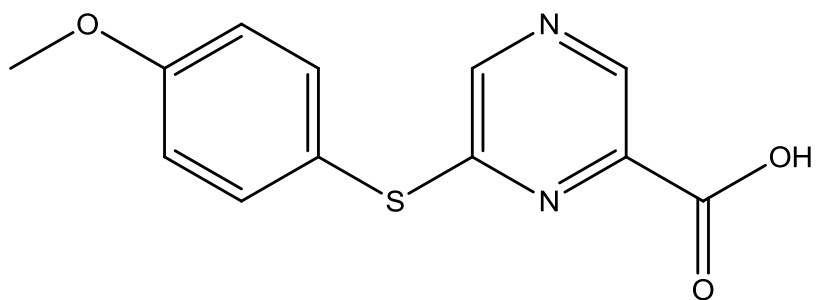


Chemical Formula: C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>

Exact Mass: 244,05

Obr. 5 : Struktura 5-(2-hydroxybenzoyl)pyrazin-2-karboxylová kyseliny (MD 5/III)

MD 72/III



6-((4-methoxyphenyl)thio)pyrazine-2-carboxylic acid

Chemical Formula: C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S

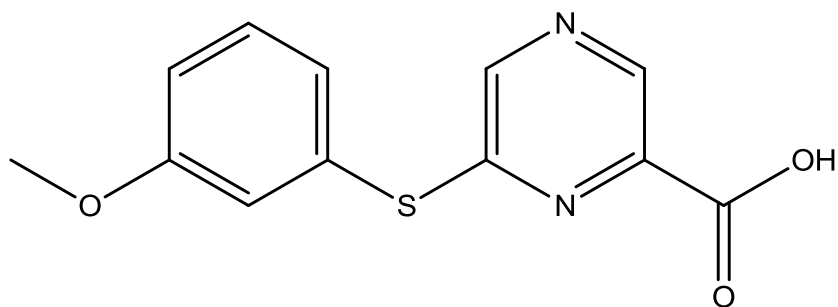
Exact Mass: 262,04

Log P: 2,03

CLogP: 2.80209

Obr. 6 : Struktura 6-((4-methoxyfenyl)thio)pyrazin-2-karboxylová kyseliny (MD 72/III)

MD 74/III



6-((3-methoxyphenyl)thio)pyrazine-2-carboxylic acid

Chemical Formula: C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S

Exact Mass: 262,04

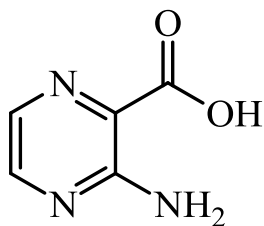
Log P: 2,03

CLogP: 2.80209

Obr. 7 : Struktura 6-((3-methoxyfenyl)thio)pyrazin-2-karboxylová kyseliny (MD 74/III)

3-aminopyrazine-2-carboxylic acid

Log P: -0,75  
CLogP: 0.126554



Chemical Formula: C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>  
Exact Mass: 244,05

Obr. 8 : Struktura 3-aminopyrazin-2-karboxylové kyseliny (MD X)

### 3.2 Použité přístroje

Během měření byly použity následující přístroje:

- Spektrofotometr HP 8453 (Hewlett-Packard)
- Spektrofotometr Spekol (Carl Zeiss, Jena)
- pH-metr inoLab 720 s pH elektrodou Sentix 61 (WTW)
- Laboratorní třepačka LT-2 (Kavalier Sázava)
- Magnetická míchačka MM4 (Laboratorní přístroje Praha)
- Digitální analytické váhy (Sartorius)

Při měření UV-VIS spekter byly používány křemenné kyvety s optickou dráhou 10 mm.

### 3.3. Příprava jednotlivých roztoků

#### Příprava roztoků derivátů kyseliny pyrazin-2-karboxylové

Navážka příslušného derivátu byla v malé kádince rozpuštěna buď v destilované vodě (byla-li v ní rozpustná) či ve směsi destilované vody a methanolu tak, aby byl podíl methanolu co nejmenší. Poté se roztok přeplnil do 25 ml baňky a doplnil destilovanou vodou. Navážka byla zvolena tak, aby konečná koncentrace roztoku byla 0,01 nebo 0,001 mol/l.

Takto připravované roztoky byly nadále používány k různým měřením.

#### Příprava Brittonova-Robinsonova pufru

Brittonův-Robinsonův pufr je "univerzálním" pufrům používaným pro rozsah hodnot pH od 2 až do 12. Tento roztok je tvořen směsí kyselin (0,04 mol/l) a určitého množství roztoku hydroxidu sodného (0,20 mol/l). Směs kyselin je připravena ze stejných dílů kyseliny borité, fosforečné a octové. Příprava Brittonova-Robinsonova pufru o určité hodnotě pH spočívá ve smíchání zmíněné směsi kyselin s roztokem hydroxidu sodného v poměru, který lze vyhledat v tabulkách. [15, 16]

### 3.4 Postup stanovení hodnot pK

#### *3.4.1 Potenciometrické stanovení*

Do 25ml kádinky bylo pipetou odměřeno 10 ml roztoku vzorku (0,001 mol/l). K tomuto roztoku byl postupně po 100  $\mu$ l dávkách odměřovaných pipetou přidáván roztok 0,01 mol/l NaOH. Pomocí pH-metru bylo změřeno pH původního roztoku vzorku (0,001 mol/l) a následně pH tohoto roztoku po každém přidavku NaOH. Roztok NaOH byl přidáván tak dlouho, dokud nebyl zaznamenán potenciálový skok. Ze získaných hodnot pH byla pomocí vzorců 27 – 32 vypočítána hodnota pK.

### ***3.4.2 Spektrofotometrické stanovení***

Připravené roztoky se stanovovanou látkou byly 10× zředěny přímo v kyvetách (tj. na koncentraci 0,0001 mol/l), 0,2 ml roztoku bylo v kyvetě doplněno 1,8 ml destilované vody; 0,1 mol/l kyseliny chlorovodíkové; 0,1 mol/l hydroxidu draselného či Brittonova-Robinsonova pufru. Pomocí spektrofotometru byla měřena absorbance jednotlivých roztoků látek vždy proti 2 ml destilované vody; 0,1 mol/l kyseliny chlorovodíkové; 0,1 mol/l hydroxidu draselného či Brittonova-Robinsonova pufru. Z naměřených spekter byly získány hodnoty absorbancí při analytické vlnové délce, z nichž lze pomocí vzorců 25 a 26 vypočítat příslušné hodnoty pK.

### ***3.4.3 Extrakčně-spektrofotometrické stanovení***

Ve zkumavce byl smíchán 1 ml roztoku měřené látky, 1 ml tetrapentylamoniumbromidu, 3 ml pufru (postupně o různém pH) a 5 ml chloroformu. Slepý vzorek byl připraven obdobně; smícháním 1 ml roztoku látky, 1 ml destilované vody, 3 ml pufru (opět postupně o různém pH) a 5 ml chloroformu. Po 20 minutách třepání byla na spektrofotometru změřena absorbance chloroformové vrstvy. Pro zjištění pK byly použity naměřené absorbance roztoků v absorpčním maximu.



## **4. VÝSLEDKOVÁ ČÁST**

### **Vzorce použité pro výpočet hodnoty pK z potenciometrických měření**

$$c_{HA} = \frac{ac'_{HA}}{X} \quad (27)$$

$$c_{OH} = \frac{bc''_{OH}}{X} = [A^-] \quad (28)$$

$$[HA] = c_{HA} - c_{OH} \quad (29)$$

$$[H^+] = 10^{-pH} \quad (30)$$

kde  $c_{HA}$  je celková koncentrace látky v roztoku,  $c_{OH}$  je koncentrace použitého hydroxidu.  $X$  znázorňuje celkový objem při měření hodnoty pH,  $a$  je počáteční objem,  $b$  přídavek hydroxidu.

$$pK_1 = pH + \log \frac{[HA]}{[A^-]} \quad (31)$$

$$pK_2 = pH + \log \frac{[HA] - [H^+]}{[A^-] + [H^+]} \quad (32)$$

### **Extrapolace potenciometrických měření na nulovou koncentraci methanolu**

K extrapolaci na nulovou koncentraci methanolu byl použit vzorec 15 ( $p_s K_a + \log [H_2O]$  proti  $1/D$ ). Příslušné hodnoty byly vyneseny proti sobě do grafu, proloženy spojnici trendů a z analytického tvaru rovnice dopočítáno hledané  $pK$ . Hodnota  $D$  pro jednotlivé poměry voda/methanol byla vypočítána dle rovnice:

$$D = x_1 D_1 + x_2 D_2, \quad (33)$$

kde  $x_1$  je objemový zlomek vody v rozpouštědle,  $x_2$  je objemový zlomek methanolu v rozpouštědle,  $D_1$  je dielektrická konstanta vody a  $D_2$  je dielektrická konstanta methanolu. Za koncentraci vody  $[H_2O]$  byl dosazen objemový zlomek  $x_1$ .

## **4.1 pK P2K**

Kyselina pyrazin -2-karboxylová je látka rozpustná ve vodě. Pro stanovení její pK hodnoty proto nebyl použit methanol.

V následujících tabulkách jsou uvedeny naměřené hodnoty příslušných veličin a vypočítané hodnoty pK pro kyselinu pyrazin-2-karboxylovou.

Tab. 2 : Naměřené hodnoty příslušných veličin a vypočítané hodnoty pK P2K při prvním měření.

pH hodnoty	$c_{\text{HA}}$	$c_{\text{OH}}$	pK <sub>1</sub> hodnoty	[H <sup>+</sup> ]	pK <sub>2</sub> hodnoty
2,64	0,00899	0,00096	3,56	0,00229	2,89
2,75	0,00824	0,00176	3,32	0,00178	2,87
2,89	0,00761	0,00243	3,22	0,00129	2,91
3,01	0,00706	0,00301	3,14	0,00098	2,90
3,15	0,00659	0,00352	3,09	0,00071	2,90
3,30	0,00618	0,00396	3,05	0,00050	2,89
3,52	0,00581	0,00434	3,05	0,00030	2,92
3,83	0,00549	0,00469	3,06	0,00015	2,96
4,50	0,00521	0,00500	3,12	0,00003	3,05

koncentrace původního roztoku = 0,00989 mol/l

Výsledné pK<sub>1</sub> = **3,18**

pH na začátku pokusu = 2,54

Výsledné pK<sub>2</sub> = **2,92**

Tab. 3 : Naměřené hodnoty příslušných veličin a vypočítané hodnoty  $pK$  P2K při druhém měření.

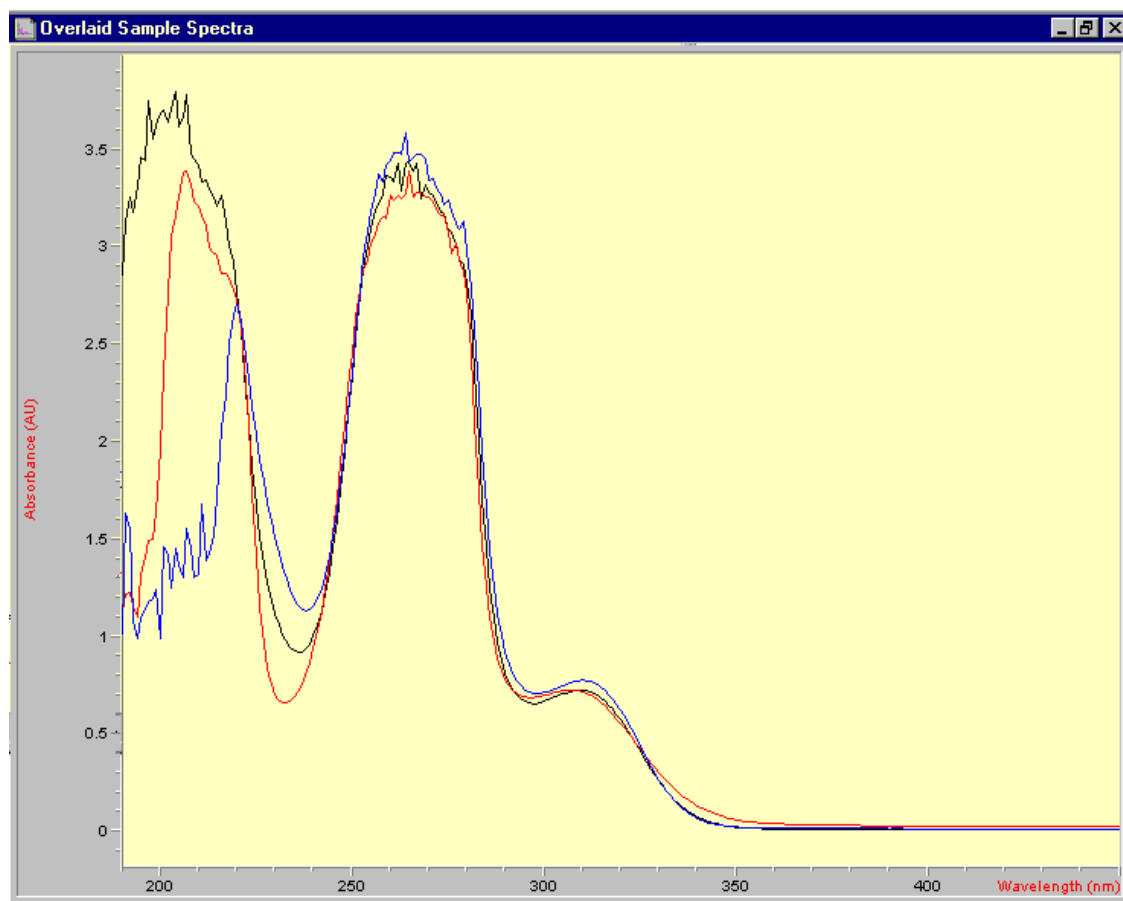
<b>pH hodnoty</b>	<b><math>c_{HA}</math></b>	<b><math>c_{OH}</math></b>	<b><math>pK_1</math> hodnoty</b>	<b><math>[H^+]</math></b>	<b><math>pK_2</math> hodnoty</b>
2,74	0,00979	0,00104	3,66	0,00182	3,12
2,85	0,00970	0,00207	3,42	0,00141	3,10
2,93	0,00960	0,00307	3,26	0,00117	3,03
3,04	0,00951	0,00406	3,17	0,00091	3,00
3,17	0,00942	0,00502	3,11	0,00068	2,98
3,31	0,00933	0,00597	3,06	0,00049	2,96
3,50	0,00924	0,00690	3,03	0,00032	2,98
3,76	0,00916	0,00781	3,00	0,00017	2,93
4,32	0,00907	0,00871	2,94	0,00005	2,87

koncentrace původního roztoku = 0,00989 mol/l

Výsledné  $pK_1 = 3,18$

pH na začátku pokusu = 2,64

Výsledné  $pK_2 = 3,00$



Obr. 9 : Spektra P2K.

- 1) 10× zředěný roztok látky P2K měřený proti vodě (černá křivka),
- 2) roztok látky P2K v HCl 0,1 mol/l (v poměru 1 : 9) měřený proti HCl 0,1 mol/l (červená křivka),
- 3) roztok látky P2K v NaOH 0,1 mol/l (v poměru 1 : 9) měřený proti NaOH 0,1 mol/l (modrá křivka)

## 4.2 pK MD 18/III

Látka MD 18/III je nerozpustná ve vodě. Pro stanovení její pK hodnoty byla použita směs vody a methanolu v poměru 17 : 8, tj. 32 % methanolu; 14 : 11, tj. 44 % methanolu a 11,5 : 13,5, tj. 54 % methanolu.

V následujících tabulkách jsou uvedeny naměřené hodnoty příslušných veličin a vypočítané hodnoty pK pro látku MD 18/III.

Tab. 4 : Naměřené hodnoty příslušných veličin a vypočítané hodnoty pK MD 18/III za použití 32 % methanolu při prvním měření.

pH hodnoty	$c_{\text{HA}}$	$c_{\text{OH}}$	pK <sub>1</sub> hodnoty	[H <sup>+</sup> ]	pK <sub>2</sub> hodnoty
3,81	0,000968	0,000107	4,72	0,000155	4,24
4,08	0,000959	0,000213	4,62	0,000083	4,43
4,53	0,000950	0,000316	4,83	0,000030	4,77

koncentrace původního roztoku = 0,00978 mol/l

Výsledné pK<sub>1</sub> = **4,72**

pH na začátku pokusu = 3,61

Výsledné pK<sub>2</sub> = **4,48**

Tab. 5 : Naměřené hodnoty příslušných veličin a vypočítané hodnoty pK MD 18/III za použití 32 % methanolu při druhém měření.

pH hodnoty	$c_{\text{HA}}$	$c_{\text{OH}}$	pK <sub>1</sub> hodnoty	[H <sup>+</sup> ]	pK <sub>2</sub> hodnoty
3,69	0,000973	0,000054	4,92	0,000204	4,13
3,81	0,000968	0,000107	4,72	0,000155	4,24
3,94	0,000964	0,000160	4,64	0,000081	4,34
4,09	0,000959	0,000213	4,63	0,000052	4,44
4,28	0,000954	0,000264	4,70	0,000052	4,59
4,57	0,000950	0,000316	4,87	0,000027	4,82

koncentrace původního roztoku = 0,00978 mol/l

Výsledné pK<sub>1</sub> = 4,75

pH na začátku pokusu = 3,61

Výsledné pK<sub>2</sub> = 4,43

Tab. 6 : Naměřené hodnoty příslušných veličin a vypočítané hodnoty pK MD 18/III za použití 44 % methanolu.

pH hodnoty	$c_{\text{HA}}$	$c_{\text{OH}}$	pK <sub>1</sub> hodnoty	[H <sup>+</sup> ]	pK <sub>2</sub> hodnoty
3,64	0,00099	0,00013	4,46	0,000229	3,82
3,78	0,00098	0,00025	4,25	0,000166	3,91
3,94	0,00097	0,00037	4,15	0,000115	4,22
4,13	0,00096	0,00049	4,11	0,000074	3,98
4,37	0,00095	0,00061	4,12	0,000043	4,03
4,76	0,00094	0,00072	4,25	0,000017	4,20

koncentrace původního roztoku = 0,00100 mol/l

Výsledné pK<sub>1</sub> = 4,22

pH na začátku pokusu = 3,55

Výsledné pK<sub>2</sub> = 4,03

Tab. 7 : Naměřené hodnoty příslušných veličin a vypočítané hodnoty pK MD 18/III za použití 54 % methanolu.

pH hodnoty	$c_{\text{HA}}$	$c_{\text{OH}}$	pK <sub>1</sub> hodnoty	[H <sup>+</sup> ]	pK <sub>2</sub> hodnoty
3,85	0,000821	0,00013	4,58	0,000141	4,16
4,03	0,000813	0,00025	4,38	0,000093	4,17
4,21	0,000805	0,00037	4,28	0,000062	4,15
4,48	0,000797	0,00049	4,28	0,000033	4,20

koncentrace původního roztoku = 0,00083 mol/l

Výsledné pK<sub>1</sub> = **4,38**

pH na začátku pokusu = 3,75

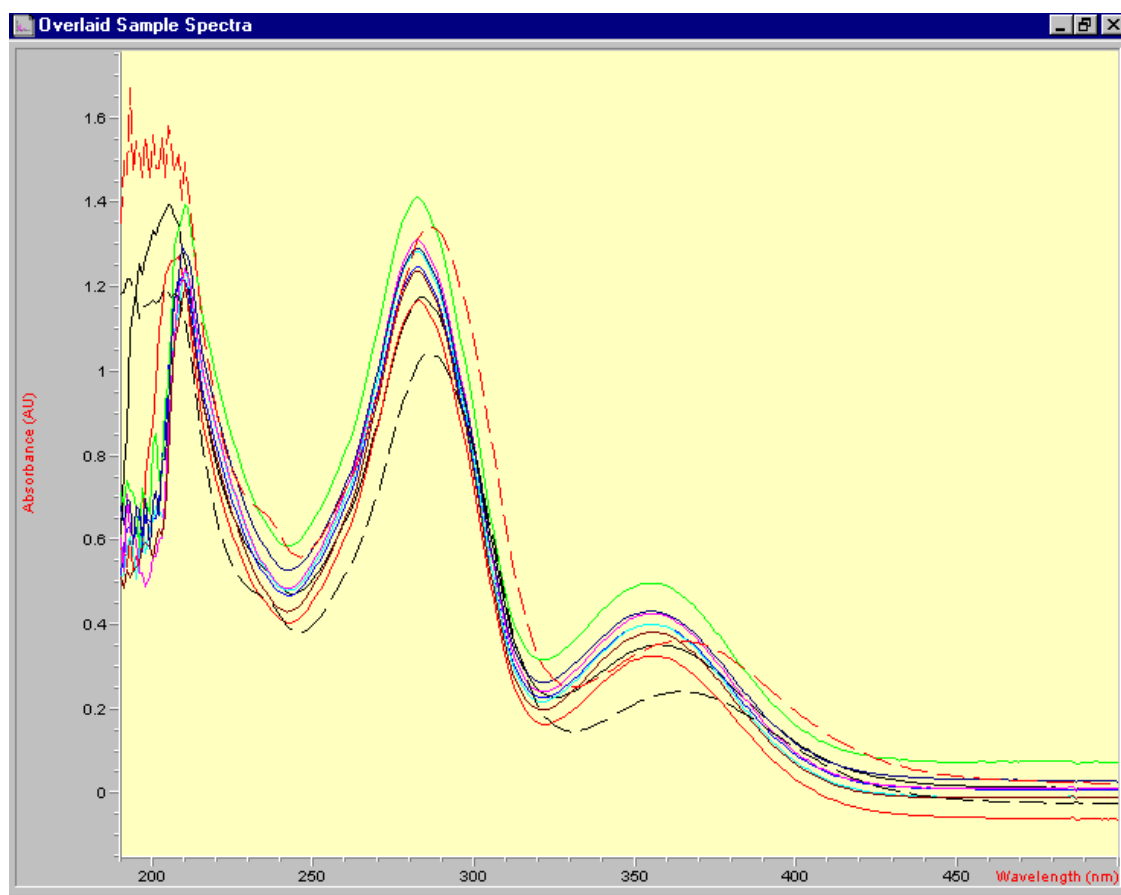
Výsledné pK<sub>2</sub> = **4,17**

### **Extrapolace potenciometrických měření na nulovou koncentraci methanolu**

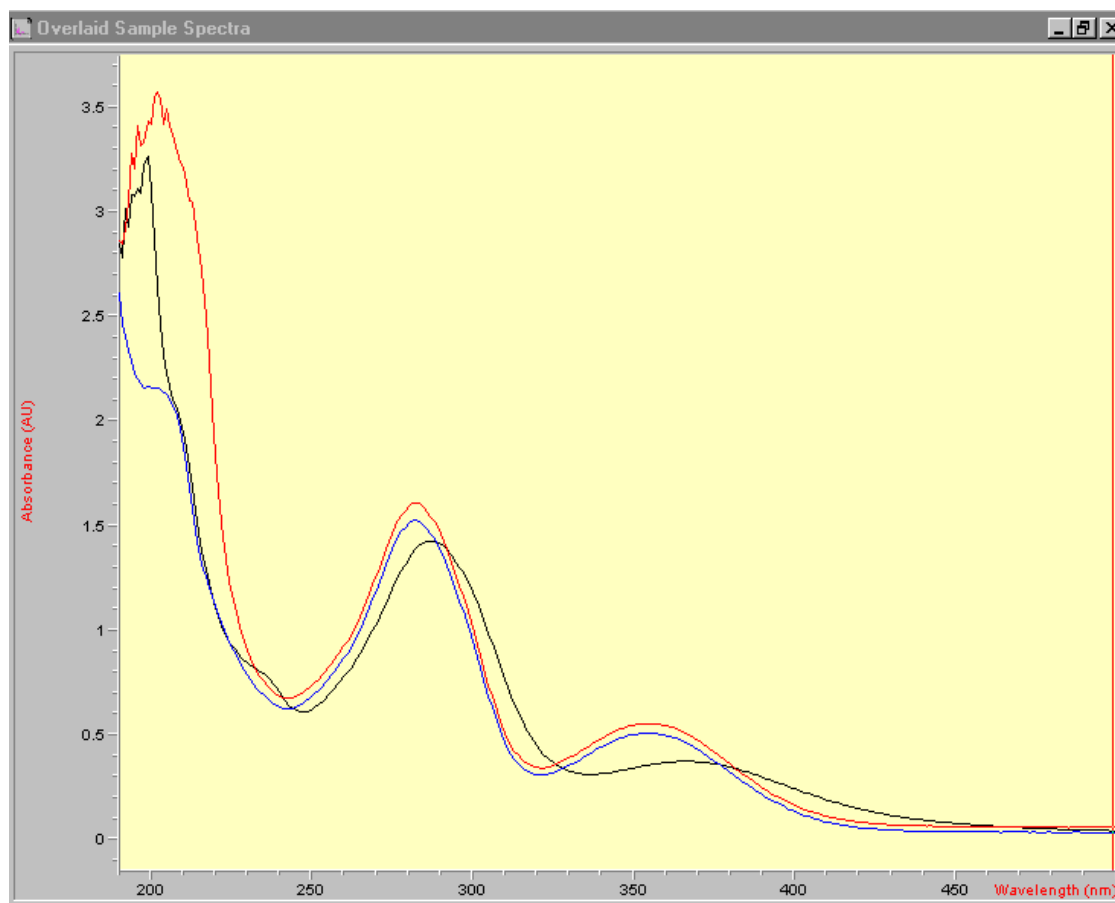
Konc. MeOH	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	1/D	log H <sub>2</sub> O
0,32	4,72	4,48	0,0154	-0,16749
0,44	4,22	4,03	0,0169	-0,25181
0,54	4,38	4,17	0,0182	-0,32790

1/D	pK <sub>1</sub> + log H <sub>2</sub> O	pK <sub>2</sub> + log H <sub>2</sub> O
0,0154	4,55251	4,31251
0,0169	3,96819	3,77819
0,0182	4,05210	3,84210
0,0125		
	<b>pK<sub>1</sub>(extr.) = 4,99</b>	<b>pK<sub>2</sub>(extr.) = 4,73</b>



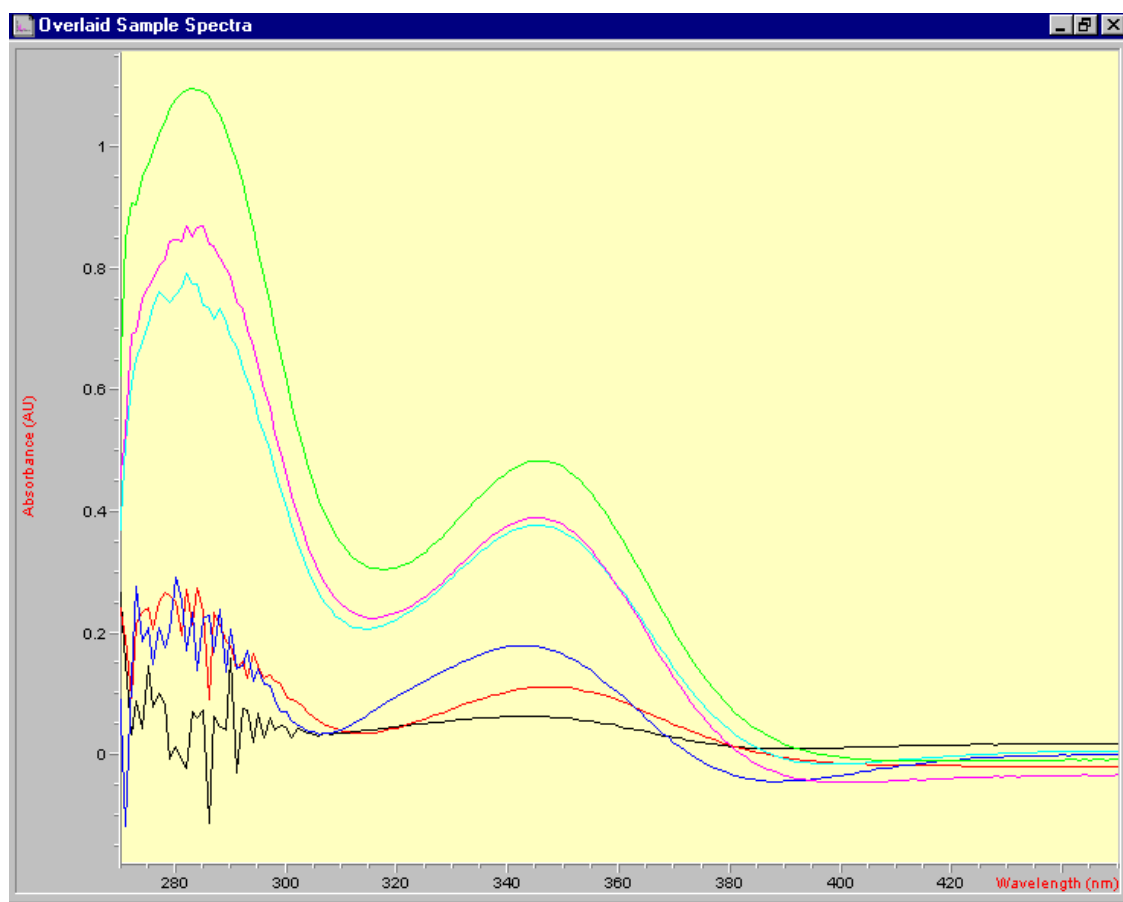


Obr. 10 : Spektra MD 18/III v rozmezí pH 3 – 9 (ředění 1 : 9) měřená proti příslušným pufrům.



Obr. 11 : Spektra MD 18/III.

- 1) 10× zředěný roztok látky MD 18/III měřený proti vodě (černá křivka),
- 2) roztok látky MD 18/III v HCl 0,1 mol/l (v poměru 1 : 9) měřený proti HCl 0,1 mol/l (červená křivka),
- 3) roztok látky MD 18/III v NaOH 0,1 mol/l (v poměru 1 : 9) měřený proti NaOH 0,1 mol/l (modrá křivka)



Obr. 12 : Spektra MD 18/III v chloroformu měřená metodou extrakční spektrofotometrie.

Z hodnot absorbancí při 345 nm byla pomocí speciálního programu vytvořeného na katedře biofyziky a fyzikální chemie získána průměrná hodnota  $pK_{4,31}$ .

### 4.3 pK MD 1/III

Látka MD 1/III je rozpustná ve vodě. Pro stanovení její pK hodnoty nebyl použit methanol.

V následujících tabulkách jsou uvedeny naměřené hodnoty příslušných veličin a vypočítané hodnoty pK pro látku MD 1/III.

Tab. 8 : Naměřené hodnoty příslušných veličin a vypočítané hodnoty pK MD 1/III při prvním měření.

pH hodnoty	$c_{\text{HA}}$	$c_{\text{OH}}$	pK <sub>1</sub> hodnoty	[H <sup>+</sup> ]	pK <sub>2</sub> hodnoty
3,21	0,00108	0,000107	4,17	0,000617	2,90
3,28	0,00107	0,000213	3,88	0,000524	2,93
3,36	0,00106	0,000316	3,73	0,000437	2,97
3,45	0,00105	0,000417	3,63	0,000355	3,01
3,57	0,00104	0,000516	3,58	0,000269	3,08
3,73	0,00103	0,000614	3,56	0,000186	3,19
3,97	0,00102	0,000709	3,61	0,000107	3,37
4,41	0,00101	0,000803	3,82	0,000039	3,71

koncentrace původního roztoku = 0,00109 mol/l

Výsledné pK<sub>1</sub> = **3,74**

pH na začátku pokusu = 3,17

Výsledné pK<sub>2</sub> = **3,15**

Tab. 9 : Naměřené hodnoty příslušných veličin a vypočítané hodnoty pK MD 1/III při druhém měření.

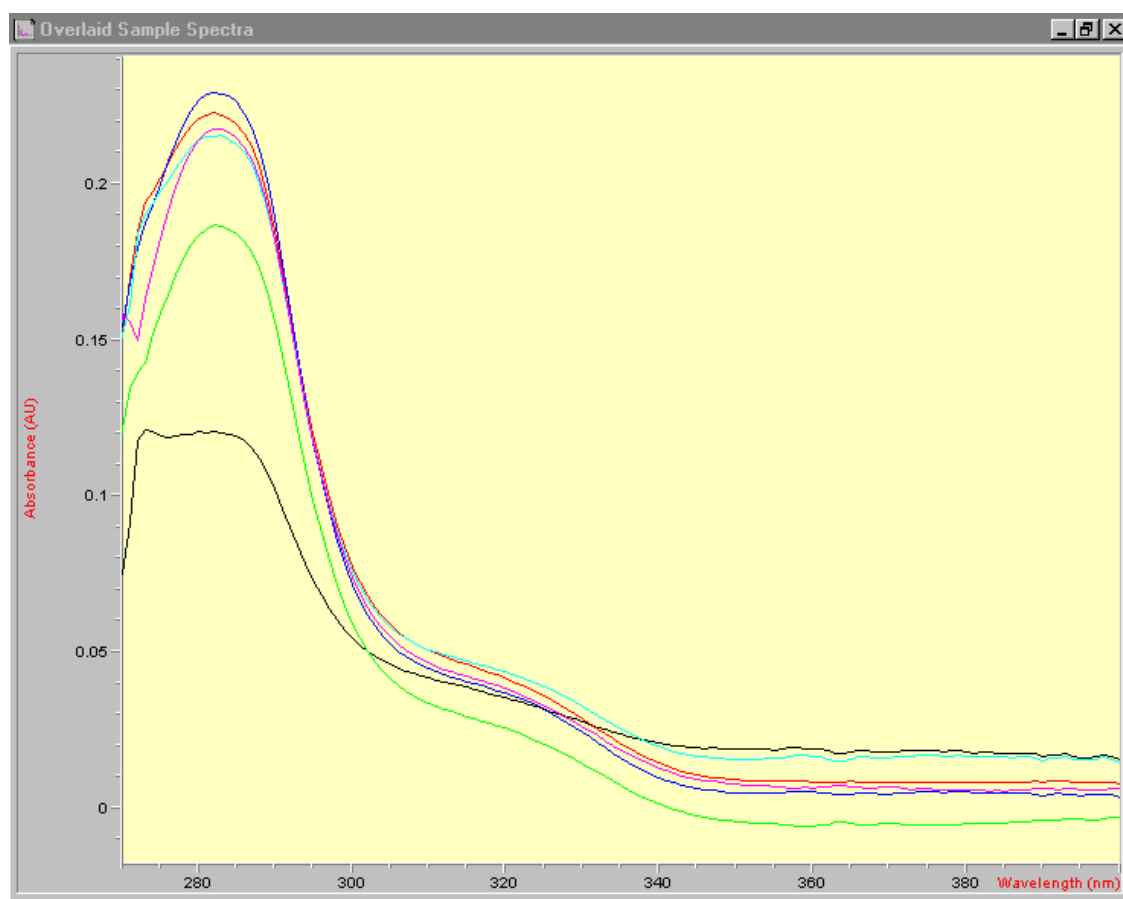
pH hodnoty	$c_{HA}$	$c_{OH}$	pK <sub>1</sub> hodnoty	[H <sup>+</sup> ]	pK <sub>2</sub> hodnoty
3,23	0,00108	0,000107	4,18	0,000589	2,97
3,30	0,00107	0,000213	3,90	0,000501	3,00
3,38	0,00106	0,000316	3,75	0,000417	3,03
3,48	0,00105	0,000417	3,66	0,000331	3,09
3,61	0,00104	0,000516	3,62	0,000245	3,17
3,76	0,00103	0,000614	3,59	0,000174	3,25
4,02	0,00102	0,000709	3,66	0,000095	3,45
4,56	0,00101	0,000803	3,97	0,000028	3,89

koncentrace původního roztoku = 0,00109mol/l

Výsledné pK<sub>1</sub> = 3,79

pH na začátku pokusu = 3,17

Výsledné pK<sub>2</sub> = 3,23



Obr. 13 : Spektra MD 1/III v chloroformu měřená metodou extrakční spektrofotometrie.

#### 4.4 pK MD 24/III

Látka MD 24/III je rozpustná ve vodě. Pro stanovení její pK hodnoty nebyl použit methanol.

V následujících tabulkách jsou uvedeny naměřené hodnoty příslušných veličin a vypočítané hodnoty pK pro látku MD 24/III.

Tab.10 : Naměřené hodnoty příslušných veličin a vypočítané hodnoty pK MD 24/III.

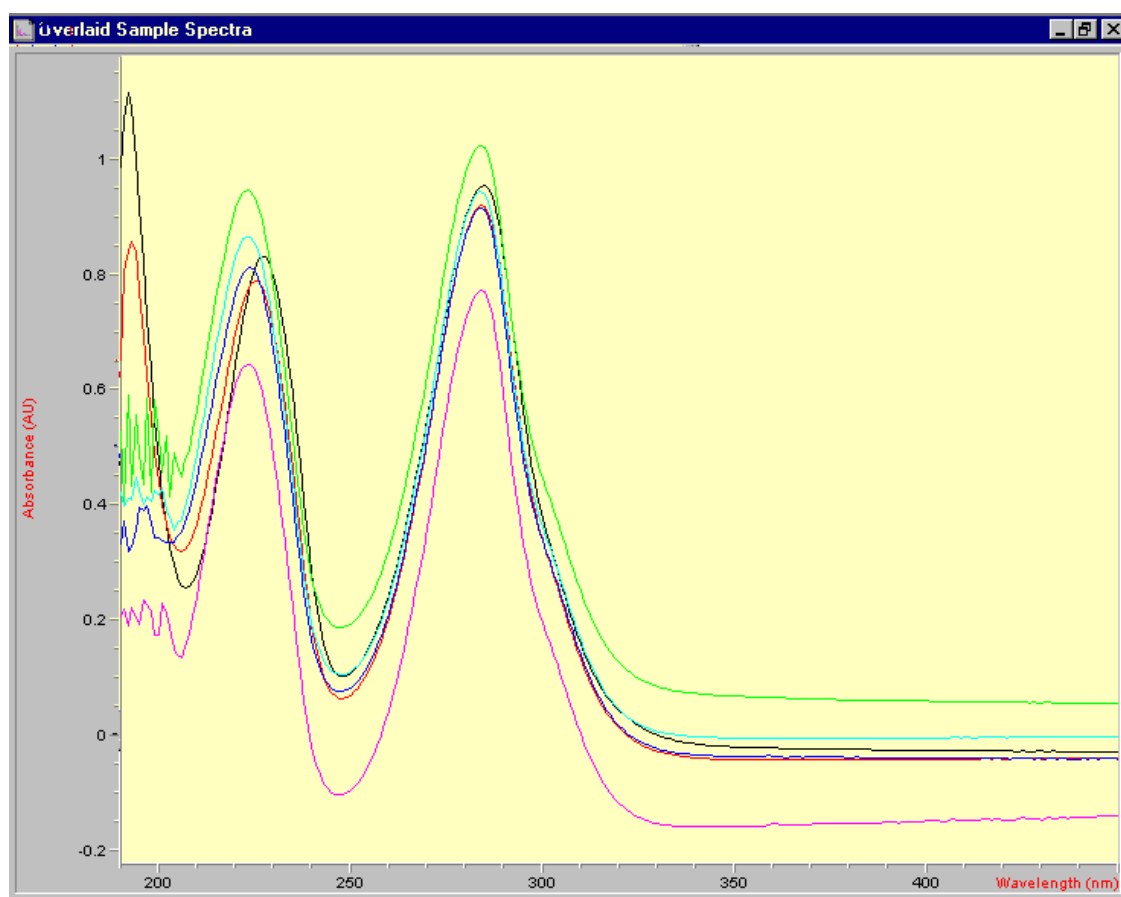
pH hodnoty	$c_{\text{HA}}$	$c_{\text{OH}}$	pK <sub>1</sub> hodnoty	$[\text{H}^+]$	pK <sub>2</sub> hodnoty
3,33	0,00104	0,000107	4,27	0,000468	3,24
3,48	0,00103	0,000213	4,06	0,000331	3,43
3,70	0,00102	0,000316	4,05	0,000200	3,69
4,09	0,00101	0,000417	4,24	0,000081	4,10

koncentrace původního roztoku = 0,00105 mol/l

Výsledné pK<sub>1</sub> = **4,16**

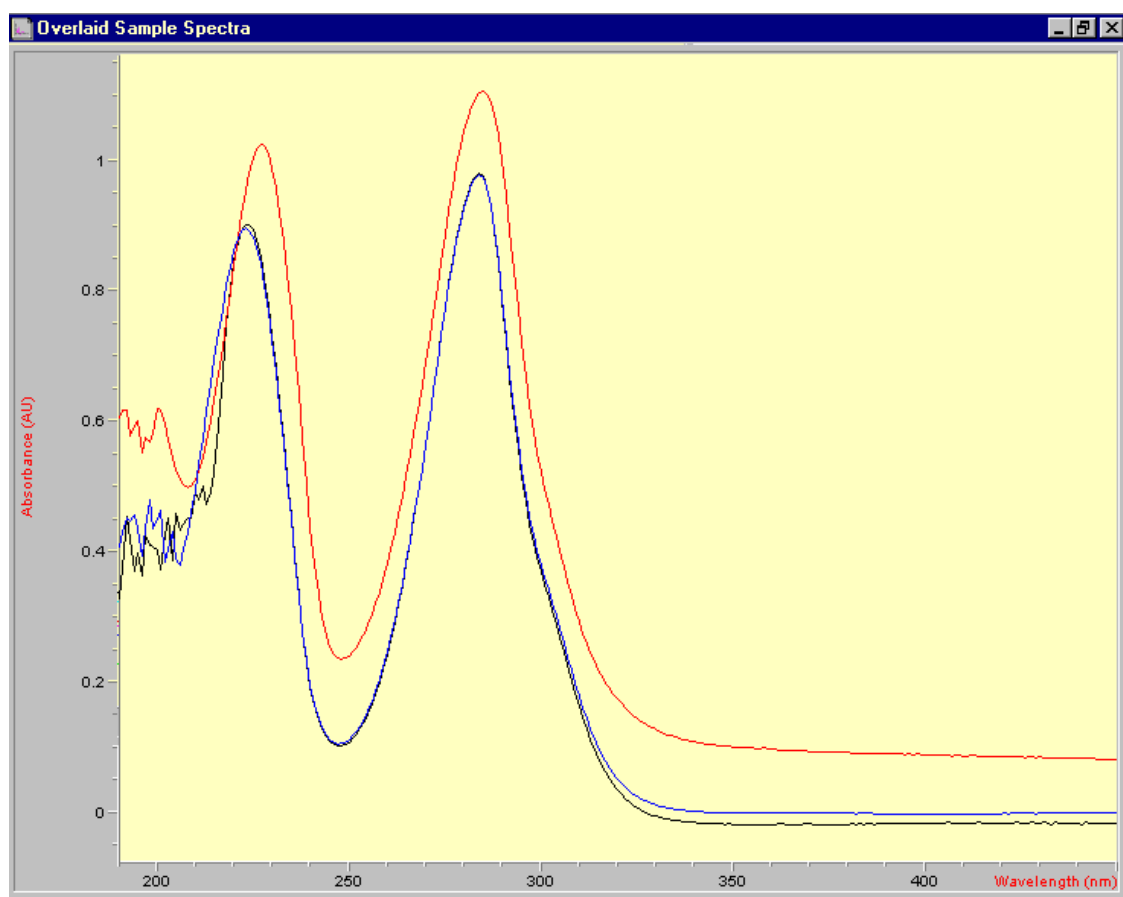
pH na začátku pokusu = 3,23

Výsledné pK<sub>2</sub> = **3,62**



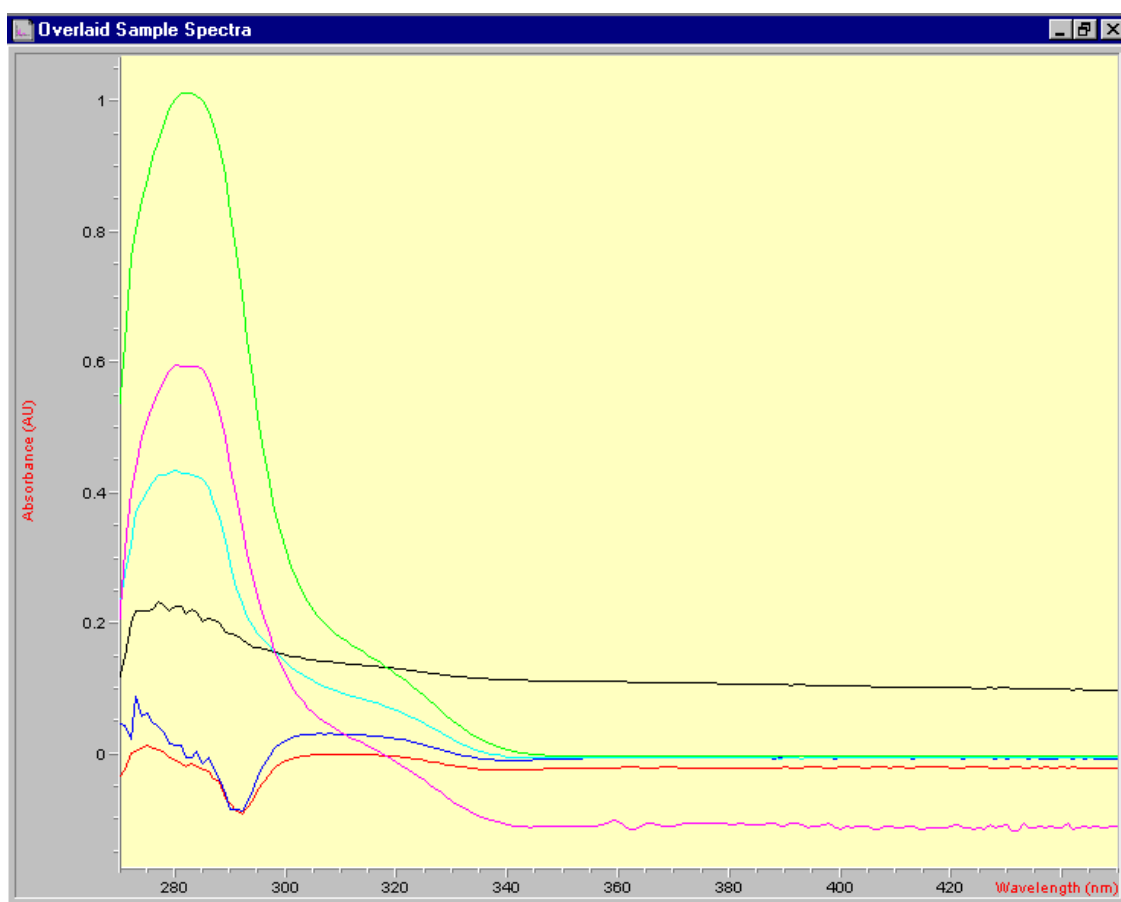
Obr. 14 : Spektra MD 24/III v rozmezí pH 2 – 7 (ředění 1 : 9) měřená proti příslušným pufrům.





Obr. 15 : Spektra MD 24/III.

- 1) 10× zředěný roztok látky MD 24/III měřený proti vodě (černá křivka),
- 2) roztok látky MD 24/III v HCl 0,1 mol/l (v poměru 1 : 9) měřený proti HCl 0,1 mol/l (červená křivka),
- 3) roztok látky MD 24/III v NaOH 0,1 mol/l (v poměru 1 : 9) měřený proti NaOH 0,1 mol/l (modrá křivka)



Obr. 16 : Spektra MD 24/III v chloroformu měřená metodou extrakční spektrofotometrie.

## 4.5 pK MD 5/III

Látka MD 5/III je nerozpustná ve vodě. Pro stanovení její pK hodnoty byla použita směs vody a methanolu v poměru 17 : 8, tj. 32 % methanolu; 14 : 11, tj. 44 % methanolu a 11,5 : 13,5, tj. 54 % methanolu.

V následujících tabulkách jsou uvedeny naměřené hodnoty příslušných veličin a vypočítané hodnoty pK pro látku MD 5/III.

Tab. 11 : Naměřené hodnoty příslušných veličin a vypočítané hodnoty pK MD 5/III za použití 32 % methanolu.

pH hodnoty	$c_{\text{HA}}$	$c_{\text{OH}}$	pK <sub>1</sub> hodnoty	[H <sup>+</sup> ]	pK <sub>2</sub> hodnoty
3,27	0,000942	0,000107	4,16	0,000537	2,94
3,34	0,000932	0,000213	3,87	0,000457	2,93
3,43	0,000923	0,000316	3,71	0,000372	2,96
3,54	0,000914	0,000417	3,62	0,000289	3,01
3,68	0,000906	0,000516	3,56	0,000209	3,08
3,87	0,000897	0,000614	3,53	0,000135	3,17
4,18	0,000889	0,000709	3,58	0,000066	3,35

koncentrace původního roztoku = 0,00095 mol/l

Výsledné pK<sub>1</sub> = **3,71**

pH na začátku pokusu = 3,20

Výsledné pK<sub>2</sub> = **3,06**

Tab. 12 : Naměřené hodnoty příslušných veličin a vypočítané hodnoty pK MD 5/III za použití 44 % methanolu.

pH hodnoty	$c_{\text{HA}}$	$c_{\text{OH}}$	pK <sub>1</sub> hodnoty	[H <sup>+</sup> ]	pK <sub>2</sub> hodnoty
3,34	0,00094	0,00013	4,13	0,000457	3,12
3,42	0,00093	0,00025	3,85	0,000380	3,10
3,53	0,00092	0,00037	3,70	0,000295	3,11
3,68	0,00091	0,00049	3,61	0,000209	3,16
3,89	0,00090	0,00061	3,57	0,000129	3,23
4,22	0,00090	0,00072	3,62	0,000060	3,48

koncentrace původního roztoku = 0,00095 mol/l

Výsledné pK<sub>1</sub> = 3,75

pH na začátku pokusu = 3,24

Výsledné pK<sub>2</sub> = 3,20

Tab. 13 : Naměřené hodnoty příslušných veličin a vypočítané hodnoty pK MD 5/III za použití 54 % methanolu.

pH hodnoty	$c_{\text{HA}}$	$c_{\text{OH}}$	pK <sub>1</sub> hodnoty	[H <sup>+</sup> ]	pK <sub>2</sub> hodnoty
3,48	0,000784	0,00013	4,18	0,000331	3,33
3,59	0,000775	0,00025	3,91	0,000257	3,31
3,72	0,000770	0,00037	3,75	0,000191	3,29
3,94	0,000762	0,00049	3,68	0,000115	3,35
4,28	0,000754	0,00061	3,65	0,000052	3,42

koncentrace původního roztoku = 0,00079 mol/l

Výsledné pK<sub>1</sub> = 3,83

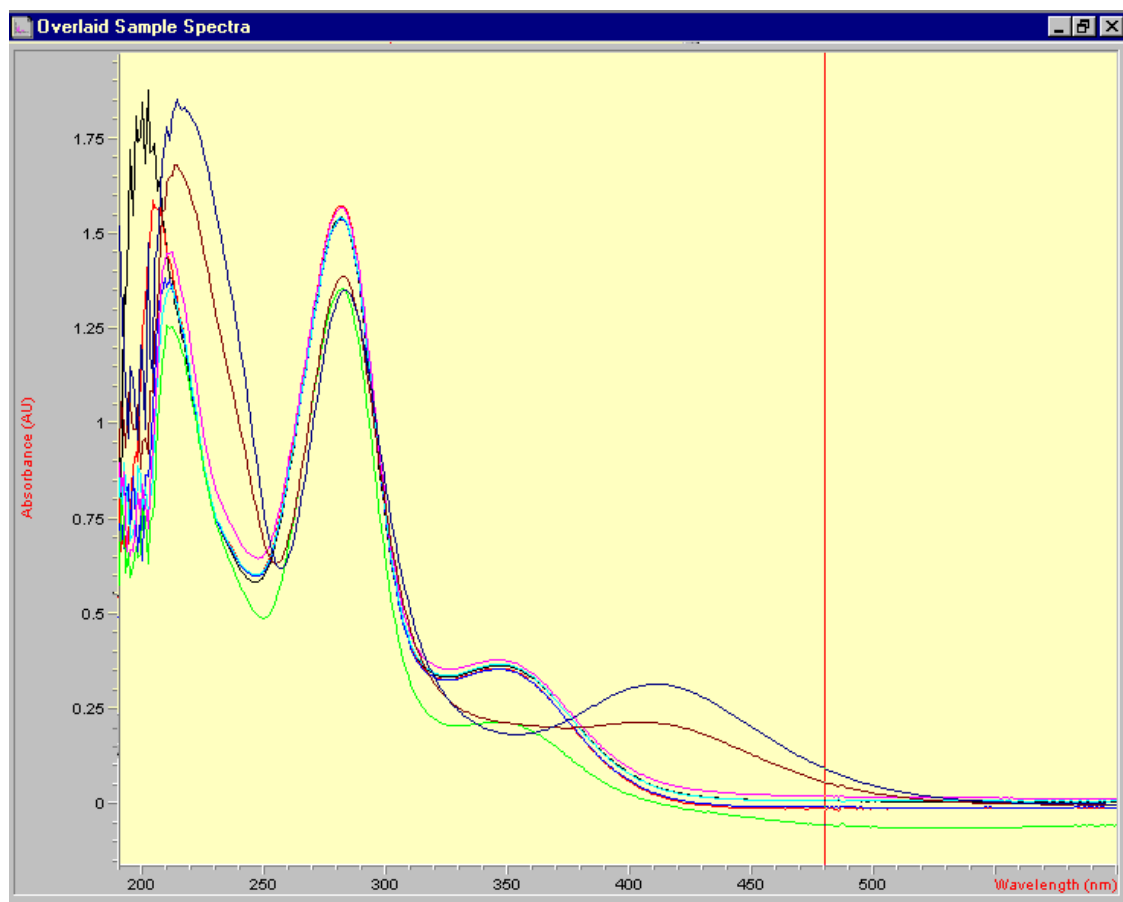
pH na začátku pokusu = 3,43

Výsledné pK<sub>2</sub> = 3,34

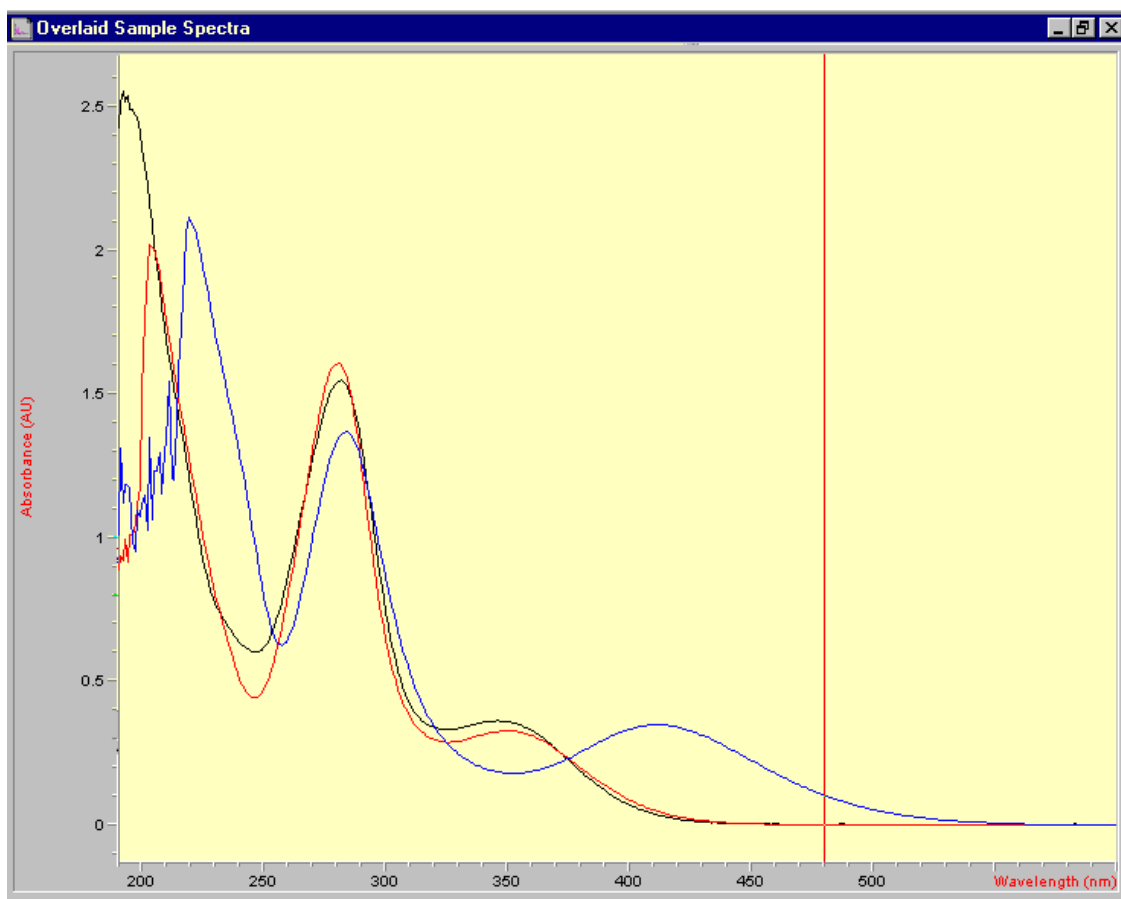
## Extrapolace potenciometrických měření na nulovou koncentraci methanolu

Konc. MeOH	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	1/D	log H <sub>2</sub> O
0,32	4,71	3,06	0,0154	-0,16749
0,44	3,75	3,20	0,0169	-0,25181
0,54	3,83	3,34	0,0182	-0,32790

1/D	pK <sub>1</sub> + log H <sub>2</sub> O	pK <sub>2</sub> + log H <sub>2</sub> O
0,0154	3,54251	2,89251
0,0169	3,49819	2,94819
0,0182	3,50210	3,01210
0,0125		
	<b>pK<sub>1</sub>(extr.) = 3,58</b>	<b>pK<sub>2</sub>(extr.) = 2,77</b>

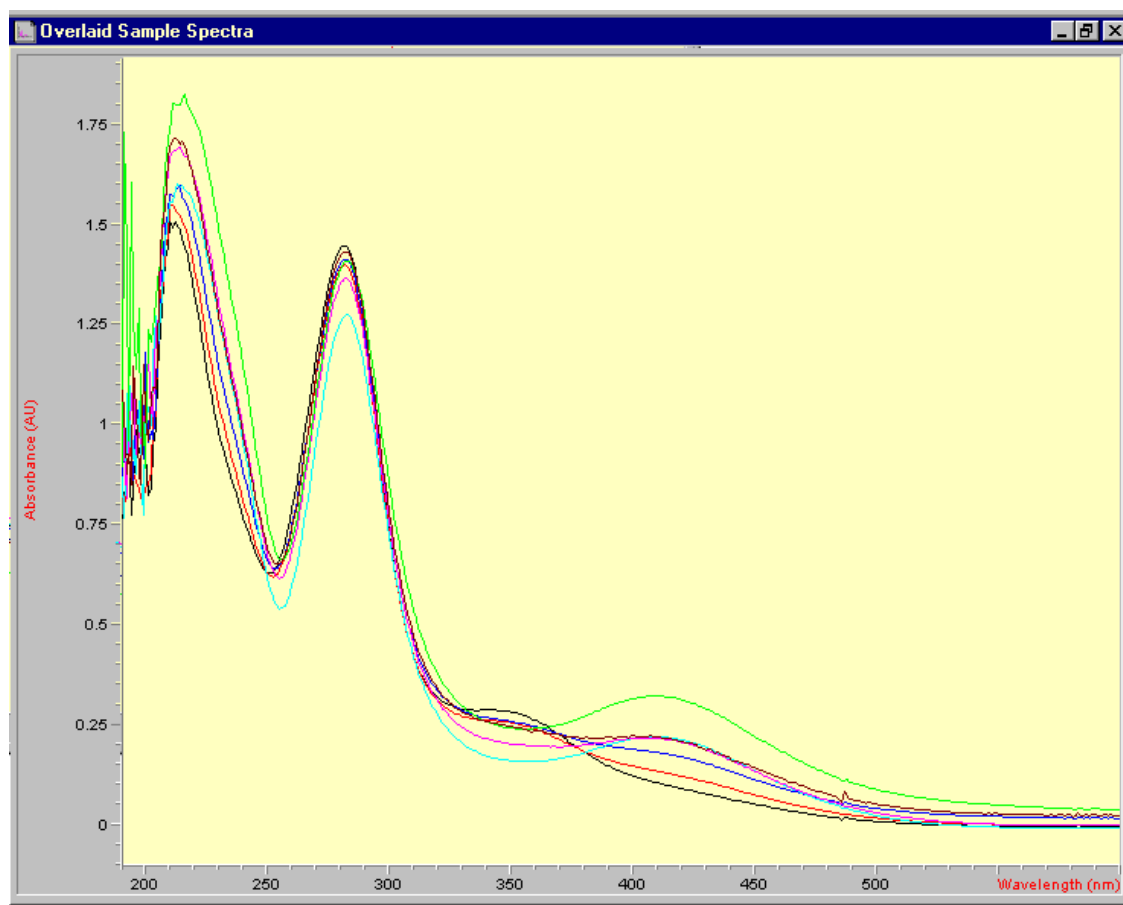


Obr. 17 : Spektra MD 5/III v rozmezí pH 3 – 10 (ředění 1 : 9) měřená proti příslušným pufrům.



Obr. 18 : Spektra MD 5/III.

- 1) 10× zředěný roztok látky MD 5/III měřený proti vodě (černá křivka),
- 2) roztok látky MD 5/III v HCl 0,1 mol/l (v poměru 1 : 9) měřený proti HCl 0,1 mol/l (červená křivka),
- 3) roztok látky MD 5/III v NaOH 0,1 mol/l (v poměru 1 : 9) měřený proti NaOH 0,1 mol/l (modrá křivka)



Obr. 19 : Spektra MD 5/III v rozmezí pH 8,3 - 9,5 (ředění 1 : 9) měřená proti příslušným pufrům.

Z hodnot absorbancí při 410 nm byla získána průměrná hodnota pK 9,14. Výpočty byly provedeny podle vzorce (25).

## 4.6 pK MD 72/III

Látka MD 72/III je nerozpustná ve vodě. Pro stanovení její pK hodnoty byla použita směs vody a methanolu v poměru 19,5 : 5,5, tj. 22 % methanolu; 16 : 9, tj. 36 % methanolu a 13,5 : 11,5, tj. 46 % methanolu.

V následujících tabulkách jsou uvedeny naměřené hodnoty příslušných veličin a vypočítané hodnoty pK pro látku MD 72/III.

Tab. 14 : Naměřené hodnoty příslušných veličin a vypočítané hodnoty pK MD 72/III za použití 22 % methanolu.

pH hodnoty	$c_{\text{HA}}$	$c_{\text{OH}}$	pK <sub>1</sub> hodnoty	[H <sup>+</sup> ]	pK <sub>2</sub> hodnoty
3,29	0,00106	0,000104	4,25	0,000513	3,15
3,38	0,00105	0,000206	3,99	0,000417	3,22
3,44	0,00104	0,000306	3,82	0,000363	3,18
3,54	0,00103	0,000403	3,73	0,000288	3,23
3,66	0,00102	0,000500	3,68	0,000219	3,28
3,81	0,00101	0,000594	3,66	0,000155	3,35
3,98	0,00100	0,000686	3,64	0,000105	3,40
4,31	0,00099	0,000777	3,75	0,000049	3,61

koncentrace původního roztoku = 0,00107 mol/l

Výsledné pK<sub>1</sub> = **3,82**

pH na začátku pokusu = 3,22

Výsledné pK<sub>2</sub> = **3,26**



Tab. 15 : Naměřené hodnoty příslušných veličin a vypočítané hodnoty pK MD 72/III za použití 36 % methanolu.

pH hodnoty	$c_{HA}$	$c_{OH}$	pK <sub>1</sub> hodnoty	[H <sup>+</sup> ]	pK <sub>2</sub> hodnoty
3,42	0,00100	0,00013	4,25	0,000380	3,40
3,53	0,00099	0,00025	4,06	0,000295	3,44
3,67	0,00098	0,00037	3,89	0,000214	3,50
3,87	0,00097	0,00049	3,86	0,000135	3,61
4,24	0,00096	0,00061	4,00	0,000058	3,88

koncentrace původního roztoku = 0,00101 mol/l

Výsledné pK<sub>1</sub> = **4,00**

pH na začátku pokusu = 3,34

Výsledné pK<sub>2</sub> = **3,57**

Tab. 16 : Naměřené hodnoty příslušných veličin a vypočítané hodnoty pK MD 72/III za použití 46 % methanolu.

pH hodnoty	$c_{HA}$	$c_{OH}$	pK <sub>1</sub> hodnoty	[H <sup>+</sup> ]	pK <sub>2</sub> hodnoty
3,54	0,000834	0,00013	4,27	0,000288	3,54
3,68	0,000825	0,00025	4,04	0,000209	3,58
3,88	0,000817	0,00037	3,96	0,000132	3,68
4,13	0,000810	0,00049	3,94	0,000074	3,77
4,57	0,000802	0,00061	4,07	0,000027	4,02

koncentrace původního roztoku = 0,00084 mol/l

Výsledné pK<sub>1</sub> = **4,06**

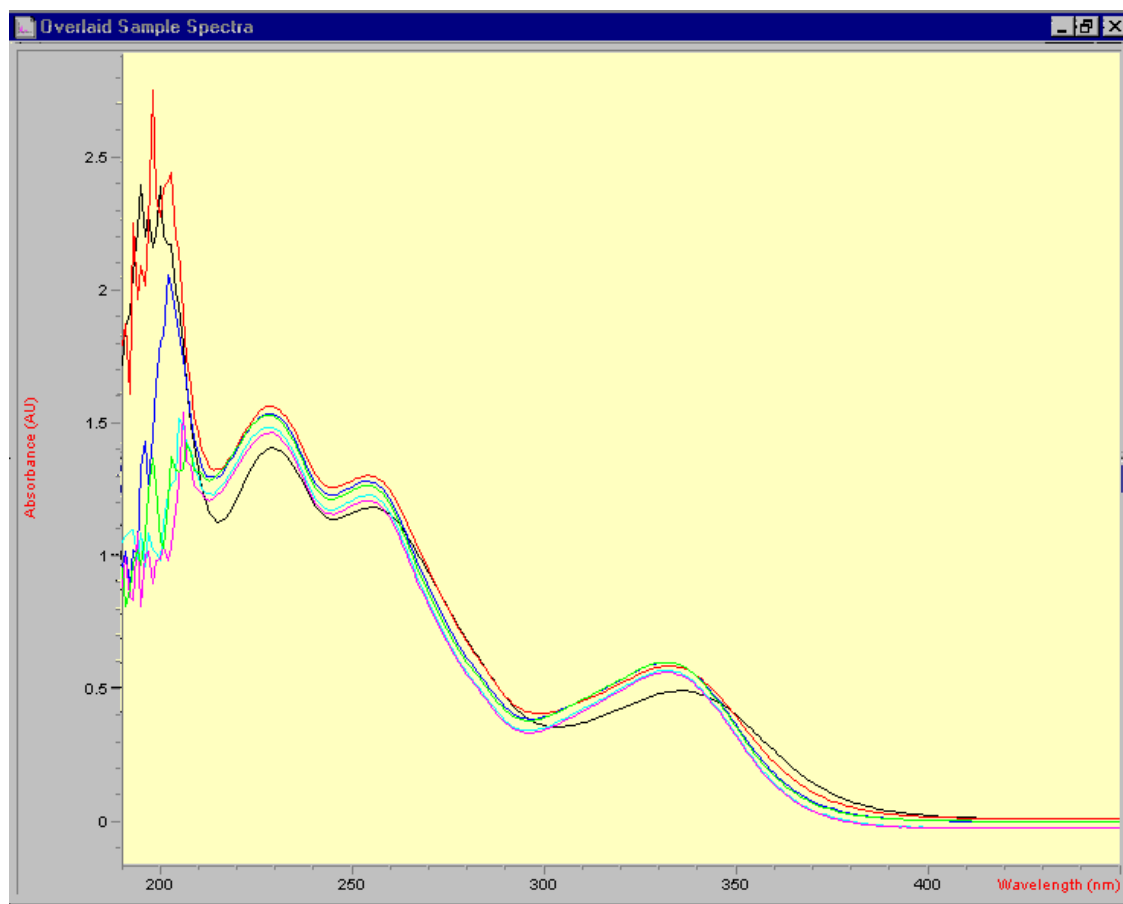
pH na začátku pokusu = 3,49

Výsledné pK<sub>2</sub> = **3,72**

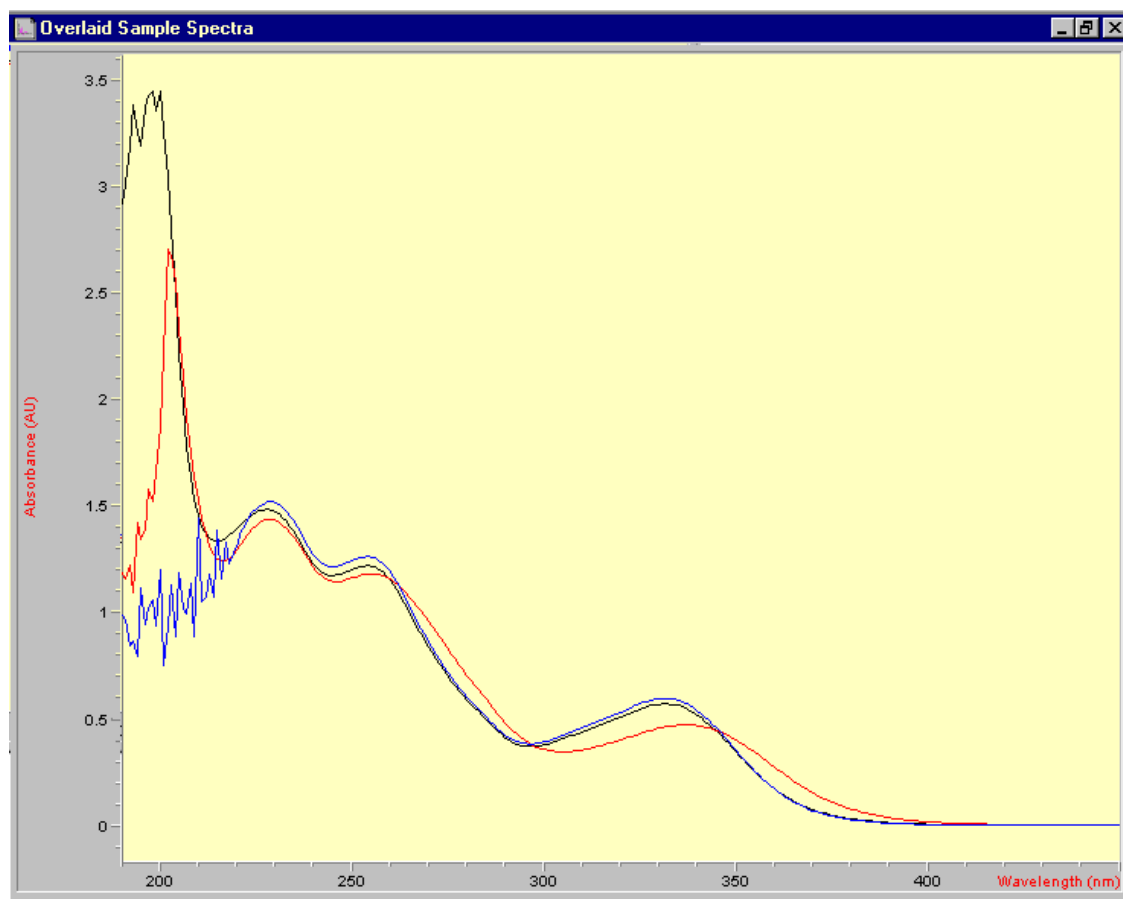
## Extrapolace potenciometrických měření na nulovou koncentraci methanolu

Konc. MeOH	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	1/D	log H <sub>2</sub> O
0,22	3,82	3,26	0,014368	-0,10791
0,36	4	3,57	0,015873	-0,19382
0,46	4,06	3,72	0,017182	-0,26761

1/D	pK <sub>1</sub> + log H <sub>2</sub> O	pK <sub>2</sub> + log H <sub>2</sub> O
0,014368	3,71209	3,15209
0,015873	3,80618	3,37618
0,017182	3,79239	3,45239
0,0125		
	<b>pK<sub>1</sub>(extr.) = 3,67</b>	<b>pK<sub>2</sub>(extr.) = 2,97</b>

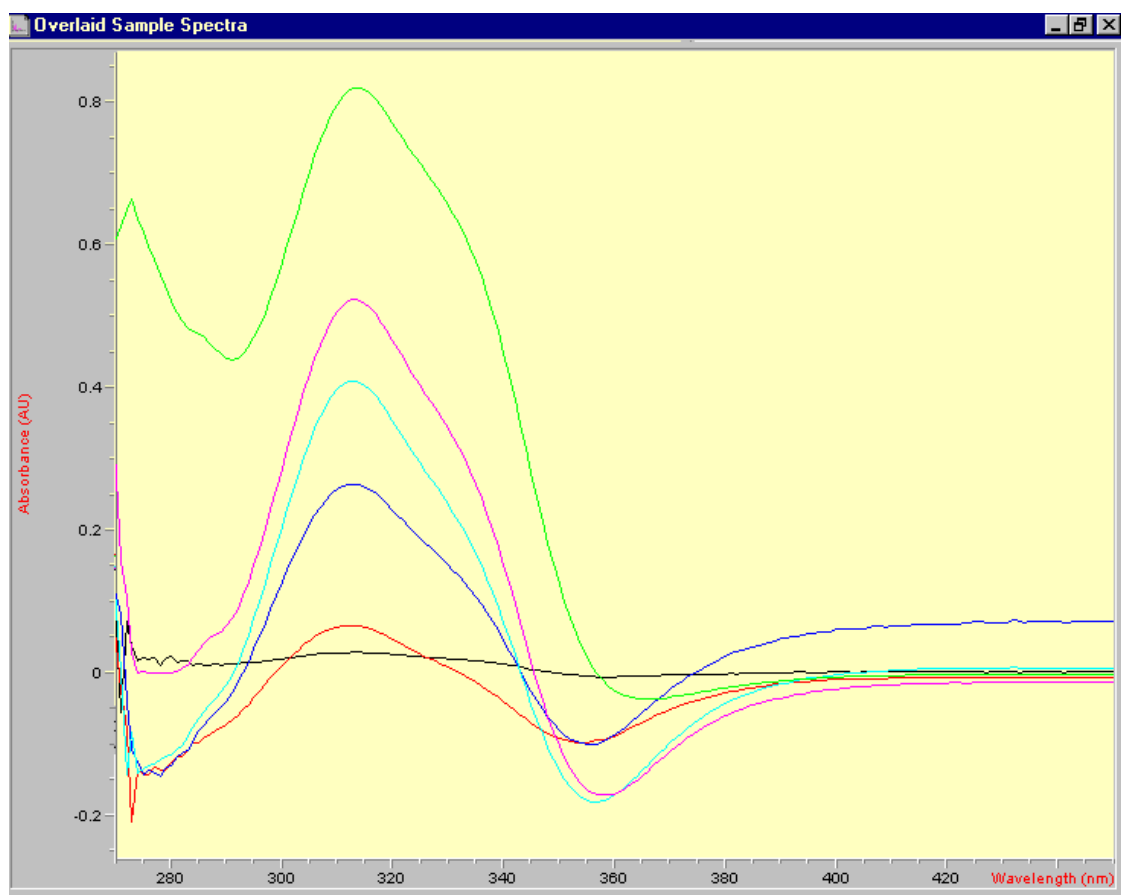


Obr. 20 : Spektra MD 72/III Roztoky v rozmezí pH 2 – 7 (ředění 1 : 9) měřená proti příslušným pufrům.



Obr. 21 : Spektra MD 72/III.

- 1) 10× zředěný roztok látky MD 72/III měřený proti vodě (černá křivka),
- 2) roztok látky MD 72/III v HCl 0,1 mol/l (v poměru 1 : 9) měřený proti HCl 0,1 mol/l (červená křivka),
- 3) roztok látky MD 72/III v NaOH 0,1 mol/l (v poměru 1 : 9) měřený proti NaOH 0,1 mol/l (modrá křivka)



Obr. 22 : Spektra MD 72/III v chloroformu měřená metodou extrakční spektrofotometrie.

## 4.7 pK MD 74/III

Látka MD 74/III je nerozpustná ve vodě. Pro stanovení její pK hodnoty byla použita směs vody a methanolu v poměru 19 : 6, tj. 24 % methanolu; 16 : 9, tj. 36 % methanolu a 13,5 : 11,5, tj. 46 % methanolu.

V následujících tabulkách jsou uvedeny naměřené hodnoty příslušných veličin a vypočítané hodnoty pK pro látku MD 74/III.

Tab. 17 : Naměřené hodnoty příslušných veličin a vypočítané hodnoty pK MD 74/III za použití 24 % methanolu.

pH hodnoty	$c_{\text{HA}}$	$c_{\text{OH}}$	pK <sub>1</sub> hodnoty	$[\text{H}^+]$	pK <sub>2</sub> hodnoty
3,35	0,000997	0,000104	4,28	0,000447	3,26
3,44	0,000987	0,000206	4,02	0,000636	3,31
3,55	0,000978	0,000306	6,89	0,000282	3,37
3,67	0,000968	0,000403	3,82	0,000213	3,43
3,85	0,000959	0,000500	3,81	0,000141	3,55
4,12	0,000950	0,000594	3,90	0,000076	3,74
4,63	0,000941	0,000686	4,20	0,000023	4,14

koncentrace původního roztoku = 0,00101 mol/l

Výsledné pK<sub>1</sub> = **3,95**

pH na začátku pokusu = 3.28

Výsledné pK<sub>2</sub> = **3,44**

Tab. 18 : Naměřené hodnoty příslušných veličin a vypočítané hodnoty pK MD 74/III za použití 36 % methanolu.

pH hodnoty	$c_{\text{HA}}$	$c_{\text{OH}}$	pK <sub>1</sub> hodnoty	[H <sup>+</sup> ]	pK <sub>2</sub> hodnoty
3,48	0,00100	0,00013	4,31	0,000331	3,55
3,60	0,00099	0,00025	4,07	0,000251	3,59
3,75	0,00098	0,00037	3,97	0,000178	3,68
3,99	0,00097	0,00049	3,98	0,000102	3,80
4,44	0,00096	0,00061	4,20	0,000036	4,13

koncentrace původního roztoku = 0,00101 mol/l

Výsledné pK<sub>1</sub> = **4,11**

pH na začátku pokusu = 3,40

Výsledné pK<sub>2</sub> = **3,75**

Tab. 19 : Naměřené hodnoty příslušných veličin a vypočítané hodnoty pK MD 74/III za použití 46 % methanolu.

pH hodnoty	$c_{\text{HA}}$	$c_{\text{OH}}$	pK <sub>1</sub> hodnoty	[H <sup>+</sup> ]	pK <sub>2</sub> hodnoty
3,72	0,000834	0,00013	4,45	0,000191	3,92
3,87	0,000825	0,00025	4,23	0,000135	3,93
4,16	0,000817	0,00037	4,24	0,000070	4,10
4,64	0,000810	0,00049	4,45	0,000023	4,40

koncentrace původního roztoku = 0,00 84 mol/l

Výsledné pK<sub>1</sub> = **4,34**

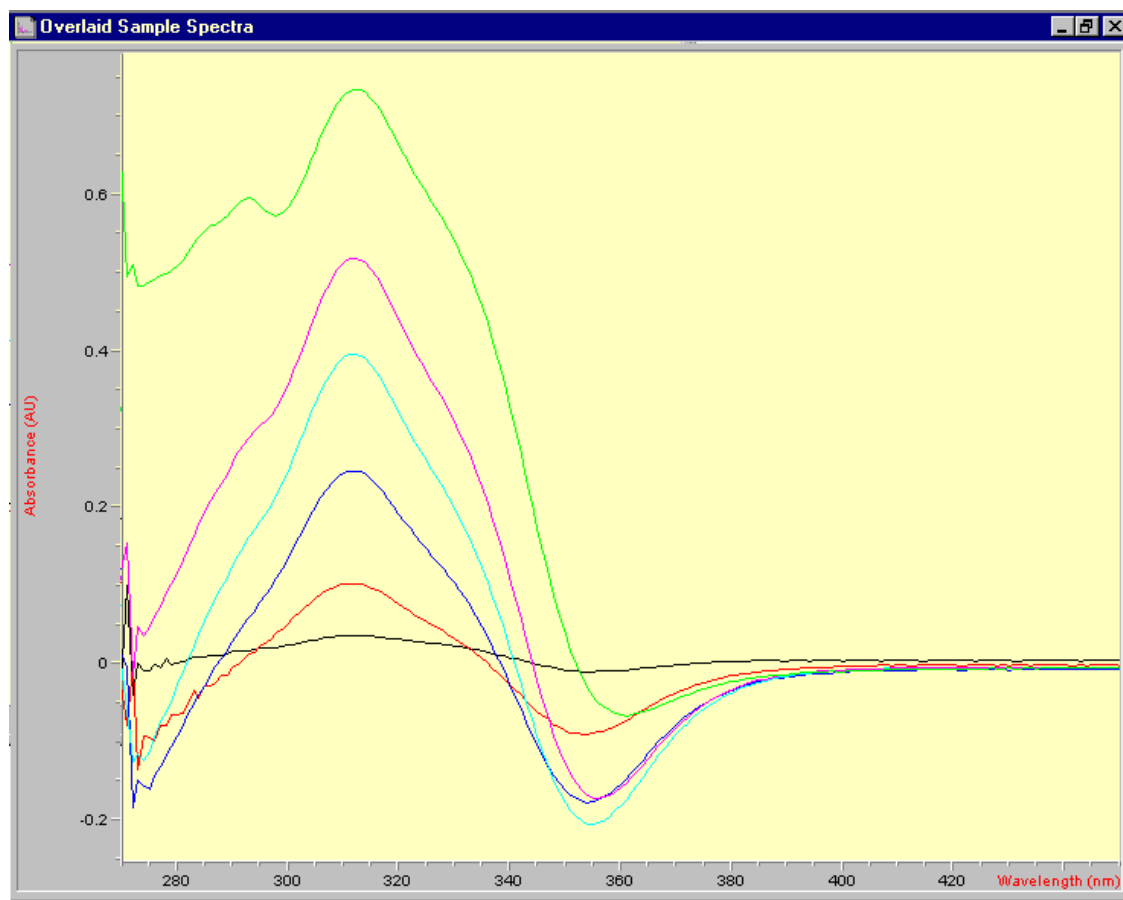
pH na začátku pokusu = 3,60

Výsledné pK<sub>2</sub> = **4,09**

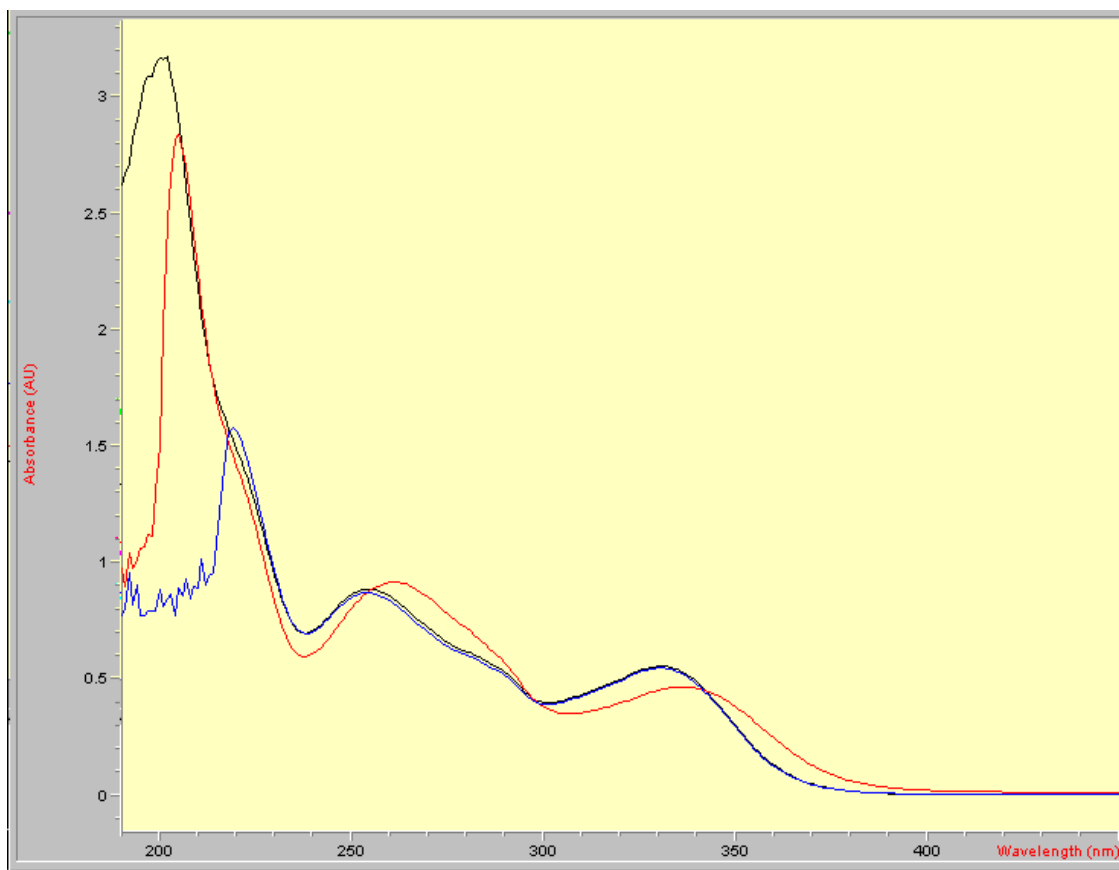
### Extrapolace potenciometrických měření na nulovou koncentraci methanolu

Konc. MeOH	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	1/D	log H <sub>2</sub> O
0,24	3,95	3,44	0,014577	-0,11919
0,36	4,11	3,75	0,015873	-0,19382
0,46	4,34	4,09	0,017182	-0,26761

1/D	pK <sub>1</sub> + log H <sub>2</sub> O	pK <sub>2</sub> + log H <sub>2</sub> O
0,014577	3,83081	3,32081
0,015873	3,91618	3,55618
0,017182	4,07239	3,82239
0,012500		
	<b>pK<sub>1</sub>(extr.) = 3,63</b>	<b>pK<sub>2</sub>(extr.) = 2,92</b>



Obr. 23 : Spektra MD 74/III v rozmezí pH 2 – 7 (ředění 1 : 9) měřená proti příslušným pufrům.



Obr. 24 : Spektra MD 74/III.

- 1) 10× zředěný roztok látky MD 74/III měřený proti vodě (černá křivka),
- 2) roztok látky MD 74/III v HCl 0,1 mol/l (v poměru 1 : 9) měřený proti HCl 0,1 mol/l (červená křivka),
- 3) roztok látky MD 74/III v NaOH 0,1 mol/l (v poměru 1 : 9) měřený proti NaOH 0,1 mol/l (modrá křivka)



## 4.8 pK látky MD X

Látka MD X je rozpustná ve vodě. Pro stanovení její pK hodnoty nebyl použit methanol.

V následujících tabulkách jsou uvedeny naměřené hodnoty příslušných veličin a vypočítané hodnoty pK pro látku MD X/III.

Tab. 20 : Naměřené hodnoty příslušných veličin a vypočítané hodnoty pK MD X/III při prvním měření.

pH hodnoty	$c_{HA}$	$c_{OH}$	pK <sub>1</sub> hodnoty	[H <sup>+</sup> ]	pK <sub>2</sub> hodnoty
3,41	0,00105	0,000105	4,36	0,000389	3,46
3,46	0,00104	0,000208	4,06	0,000347	3,40
3,52	0,00103	0,000309	3,89	0,000302	3,36
3,58	0,00102	0,000408	3,76	0,000263	3,30
3,65	0,00101	0,000505	3,65	0,000224	3,24
3,71	0,00100	0,000601	3,53	0,000195	3,12
3,78	0,00099	0,000694	3,41	0,000166	2,96

koncentrace původního roztoku = 0,00107 mol/l

Výsledné pK<sub>1</sub> = 3,66

pH na začátku pokusu = 3,36

Výsledné pK<sub>2</sub> = 3,26

Tab. 21 : Naměřené hodnoty příslušných veličin a vypočítané hodnoty  $pK$  MD X/III při druhém měření.

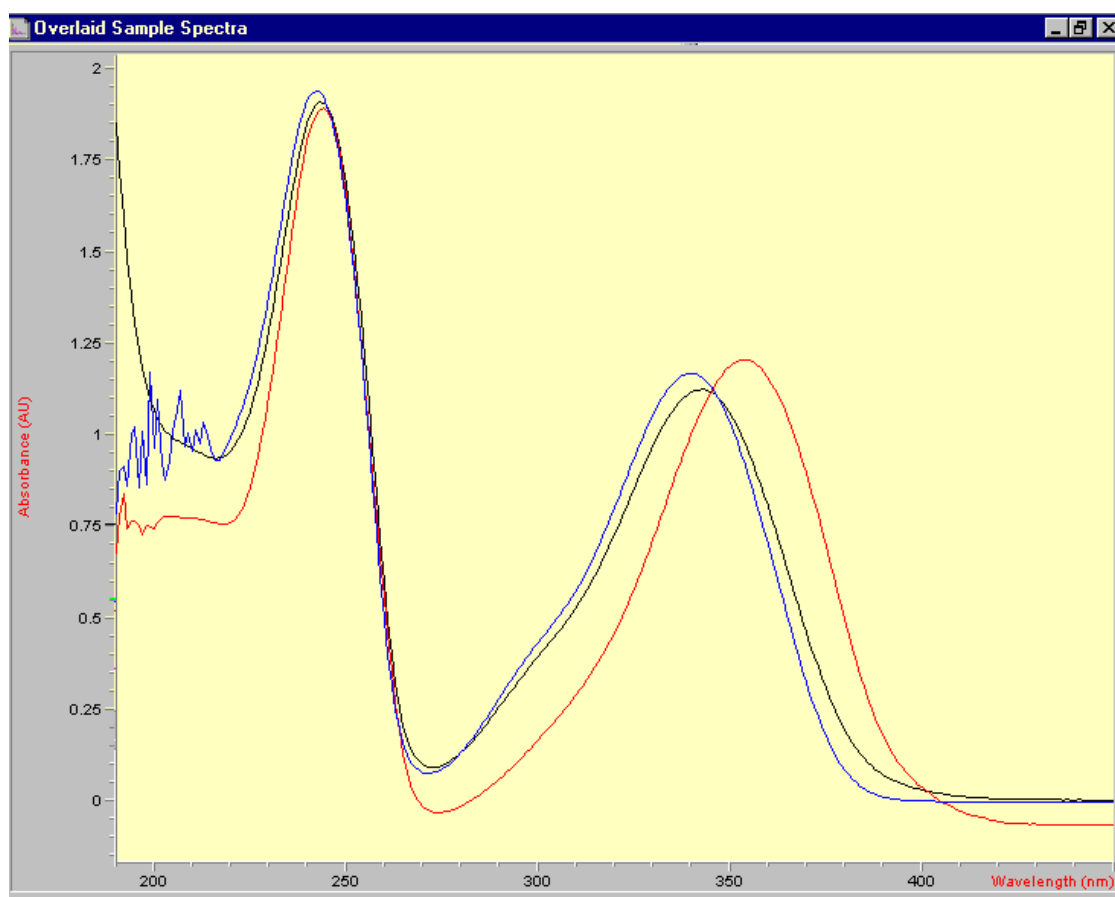
<b>pH hodnoty</b>	<b><math>c_{HA}</math></b>	<b><math>c_{OH}</math></b>	<b><math>pK_1</math> hodnoty</b>	<b><math>[H^+]</math></b>	<b><math>pK_2</math> hodnoty</b>
2,84	0,0103	0,000105	4,83	0,00145	3,59
2,97	0,0102	0,000208	4,65	0,00107	3,81
3,11	0,0101	0,000309	4,61	0,000078	4,03
3,26	0,0100	0,000408	4,63	0,00055	4,23
3,35	0,0099	0,000505	4,62	0,00045	4,32
3,47	0,0099	0,000601	4,66	0,00039	4,42
3,57	0,0098	0,000694	4,69	0,00027	4,53
3,69	0,0097	0,000786	4,74	0,000020	4,63
3,80	0,0096	0,000876	4,80	0,00016	4,71
3,90	0,0095	0,000965	4,85	0,00013	4,79
4,02	0,0094	0,001050	4,92	0,00010	4,88
4,12	0,0093	0,001140	4,97	0,00008	4,94
4,27	0,0092	0,001220	5,09	0,00005	5,07
4,43	0,0092	0,001300	5,21	0,00004	5,20

koncentrace původního roztoku = 0,01045 mol/l

Výsledné  $pK_1 = 4,81$

pH na začátku pokusu = 2,74

Výsledné  $pK_2 = 4,51$



Obr. 25 : Spektra MD X/III.

- 1) 10× zředěný roztok látky MD X/III měřený proti vodě (černá křivka),
- 2) roztok látky MD X/III v HCl 0,1 mol/l (v poměru 1 : 9) měřený proti HCl 0,1 mol/l (červená křivka),
- 3) roztok látky MD X/III v NaOH 0,1 mol/l (v poměru 1 : 9) měřený proti NaOH 0,1 mol/l (modrá křivka)

Tab. 22 : Přehled získaných hodnot pK studovaných látek všemi použitými metodami.

Látka	pK <sub>1</sub> – potenciometrie	pK <sub>2</sub> – potenciometrie	pK - spektrofotometrie	pK – extrakční spektrofotometrie
P2K	3,18	2,96		
MD 1/III	3,77	3,19		
MD 24/III	4,16	3,62		
MD 18/III	4,99	4,73		4,31
MD 5/III	3,58	2,77	9,14	
MD 72/III	3,67	2,97		
MD 74/III	3,63	2,92		
MD X	4,81	4,51		

## **5. DISKUZE**

V této diplomové práci byly stanovovány hodnoty disociačních konstant kyseliny pyrazin-2-karboxylové a jejích derivátů. Ke stanovení disociačních konstant byla použita především potenciometrie, spektrofotometrie a extrakční spektrofotometrie.

U části studovaných látek byla problémem jejich rozpustnost ve vodě. Pokud se látka nerozpouštěla ani v horké vodě, bylo nutné rozpustit ji ve směsi vody a methanolu. Čistá destilovaná voda se jako rozpouštědlo osvědčila jen u čtyř látek (P2K, MD 1/III, MD 24/III, MD X). U zbylých látek byla jako rozpouštědlo použita směs voda/methanol (MD 18/III, MD 5/III, MD 72/III, MD 74/III). Měření zdánlivých disociačních konstant ve směsi voda/methanol bylo provedeno při třech různých poměrech složek této směsi. Protože literatura [12] doporučuje používat co nejnížší podíl methanolu, nejlépe do 40 % objemových, bylo nejprve prováděno měření při co nejnižším obsahu methanolu. Následně byl při měřeních obsah methanolu v rozpouštědle navyšován, vždy přibližně o 10 %, aby bylo možno provést extrapolaci na nulový obsah methanolu. To vedlo u látky MD 5/III ke zvýšení hodnoty pK o 1 až 2 %, u látky MD 72/III o 2 až 5 % a u látky MD 74/III o 4 až 5 %. U látky MD 18/III se po prvním navýšení přídavku methanolu hodnota pK snížila o 11 %, u druhého přídavku se zvýšila o 4 % vzhledem k prvnímu vyššímu přídavku methanolu. Lze se domnívat, že tento jev u látky MD 18/III je důsledkem přítomnosti sekundární aminoskupiny v molekule, protože u ostatních látek tato skupina chybí.

Extrapolované hodnoty pK byly u látek MD 5/III, MD 72/III, MD 74/III nižší, než pK hodnoty získané rozpuštěním látek ve směsi voda/methanol, u látky MD 18/III byly naopak vyšší. K největšímu poklesu pK hodnot došlo u látky MD 74/III - o 8 % (za použití vzorce 31) a o 15 % (za použití vzorce 32) vzhledem k nejnižšímu obsahu methanolu. U látek MD 72/III a MD 5/III byl pokles pK hodnot totožný – o 4 % za použití vzorce 31) a o 9 % (za použití vzorce 32). Látka MD 18/III se opět vymykala. Zde došlo k nárůstu pK hodnot – v obou případech o 6 %.

Nalezené disociační konstanty se pohybují přibližně v rozmezí od hodnoty pK 3 po pK 5, což vede k závěru, že se jedná o poměrně silné kyseliny. V nedisociované formě se budou vyskytovat při hodnotách pH přibližně 1 – 3. To znamená, že například z prostředí žaludku by se mohly vstřebávat poměrně dobře. Při této úvaze je ovšem třeba mít na paměti, že v kyselém prostředí se budou protonovat aminoskupiny u látek MD 18/III a MD X, případně dusíky pyrazinového kruhu.

Acidobazické vlastnosti mají význam i při vazbě léčiv na plazmatické bílkoviny. To, že se jedná o relativně silné kyseliny, způsobí, že by se mohly relativně silně vázat na albumin.

Tab. 22 uvádí přehled naměřených pK hodnot třemi metodami. U látek, které nebyly rozpustné v čisté vodě, tato tabulka uvádí hodnoty extrapolované na nulový obsah methanolu v rozpouštědle. Je z ní patrné, že potenciometricky bylo vždy dosaženo výsledku, zatímco extrakční spektrofotometrie a spektrofotometrie byly úspěšné vždy jen v jednom případě. U potenciometrické metody jsou uváděny vždy dvě hodnoty pK počítané buď jednoduchým ( $pK_1$ ) nebo přesnějším ( $pK_2$ ) vzorcem. Vzhledem k tomu, že obě hodnoty se většinou významně liší, je za správnou hodnotu považována  $pK_2$ .

U látky MD X bylo potenciometrické měření provedeno dvakrát. Při prvním měření však výsledná  $pK_2$  hodnota vyšla nižší, než původní pH roztoku látky MD X, což je nelogické. Z tohoto důvodu není toto měření zahrnuto v souhrnných výsledcích.

Pro látku MD 18/III byly výsledné hodnoty pK získány pomocí potenciometrie a extrakční spektrofotometrie. Hodnota pK plynoucí z extrakční spektrofotometrie je poněkud nižší ( $pK = 4,31$ ) než hodnota pK získaná potenciometrickým měřením ( $pK_1 = 4,99$ ;  $pK_2 = 4,73$ ), avšak shodu hodnot získaných oběma metodami je možné považovat za dobrou.

U látky MD 5/III bylo dosaženo hodnot pK dvěma metodami. Zde byly získány zcela odlišné hodnoty. Potenciometrickým měřením jsme získali hodnoty  $pK_1 = 3,58$  a  $pK_2 = 2,77$ . Pomocí spektrofotometrie pak hodnotu  $pK = 9,14$ . Hodnota získaná potenciometricky je pK hodnotou karboxylové skupiny, zatímco spektrofotometricky získaná hodnota pK odpovídá skupině fenolové.

Potenciometrická metoda se podle výsledků této diplomové práce ukazuje jako obecně použitelná, protože poskytla hodnoty pK u všech studovaných látek. Obě optické metody naproti tomu byly použitelné jen velmi omezeně. V případě metody UV-VIS spektrofotometrické nebylo ve většině případů možné najít analytickou vlnovou délku, protože molekulová a ionizovaná forma studovaných léčiv se výrazně nelišily ve svých absorpčních spektrech. Získání pK hodnoty fenolové skupiny v molekule látky MD 5/III touto metodou je ovšem příjemnou skutečností.

V případě extrakční spektrofotometrie nebyla ve většině případů nalezena A-pH křivka v takovém průběhu, který by umožňoval vyhodnocení pK. Je ovšem třeba mít na zřeteli skutečnost, že experimenty byly komplikovanější, než se původně očekávalo.

Nebylo totiž možné provádět je klasickou zkumavkovou metodou [13], protože chloroformová fáze absorbovala při nižších vlnových délkách, na které spektrofotometr Spekol, vybavený k měření absorbancí ve zkumavkách, již nestačil. Proto bylo třeba chloroformovou fázi ze zkumavek odsát a měřit pomocí spektrofotometru HP 8453 v běžných uzavřených křemenných kyvetách. Tyto dodatečné manipulace patrně vnesly do měření významnou chybu. Pozitivní skutečností naopak je, že se podařilo změřit hodnotu  $pK$  u látky MD 18/III, která byla rozpuštěna ve směsném rozpouštědle methanol/voda.

Jen u jediné látky, kyseliny pyrazin-2-karboxylové, je možné provést srovnání hodnoty  $pK$  naměřené v této práci a její literární hodnoty. Literární hodnota [17] je 2,91 - což se velmi dobře shoduje s hodnotou 2,96 z této práce. Na základě této shody je možné se domnívat, že  $pK$  hodnoty měřené v této práci jsou dostatečně správné.



## **6. ZÁVĚR**

Cílem této diplomové práce bylo nalézt hodnoty disociačních konstant kyseliny pyrazin-2-karboxylové a jejích derivátů za použití vody či směsi methanol/voda jako rozpouštědla. U látek nerozpustných ve vodě byly odzkoušeny tři různé poměry vody a methanolu.

U všech látek se podařilo změřit hodnoty pK potenciometrickou metodou. Jen v jednom případě byla hodnota pK zjištěna také metodou extrakční spektrofotometrie a v jednom případě byla zjištěna hodnota pK jiné funkční skupiny spektrofotometrií v UV-VIS oblasti. Vzhledem k těmto skutečnostem nebylo možné provést kvalitní porovnání jednotlivých použitých metod.

Shoda literární a naměřené hodnoty pK kyseliny pyrazin-2-karboxylové je kritériem správnosti hodnot pK zjištěných potenciometrickou metodou v této práci.

Naměřené hodnoty pK budou předány na katedru farmaceutické chemie a kontroly léčiv, kde budou spolu s dalšími parametry sloužit k vyhodnocení postupu dalšího výzkumu studovaných léčiv.

## **7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] web wikipedia, <http://cs.wikipedia.org/wiki/Potenciometrie>
- [2] Milward A.F: *Analyst* 94 (1969), 154
- [3] Perrin D.D., Sayce I.G.: *Chem. Ind.* (1966), 661
- [4] Irving H.M a Williams R.J.P.: *J. Chem, Soc.* (1950), 2890
- [5] Hall N.F. a Sprinkle M.R.: *J. Amer. Chem. Soc.* 54 (1932), 3469
- [6] Pring J.N.: *Trans. Farad. Soc.* 19 (1924), 705
- [7] de Ligny C.L., Loriaux H. a Ruiter A.: *Rec. Trav. chim. Pays-Bas* 80 (1961), 725
- [8] Kolthoff I.M., Lingane J.J. a Larson W.D.: *J. Amer. Chem. Soc.* 60 (1938), 2512
- [9] Grunwald E. a Berkowitz B.J.: *J. Amer. Chem. Soc.* 73 (1951), 4939
- [10] Shedlovsky T., in *Eletrolytes*, (ed. B. Pesce) Pergamon, New York, 1962, s. 146
- [11] web wikipedia, <http://cs.wikipedia.org/wiki/Spektrofotometrie>
- [12] Albert A., Serjeant E.P.: *The Determination of Ionization Constants*, Chapman and Hall, London, 1984
- [13] Gasparič J., Baruchová A., Horká I.: *Chem. Listy* 80 (1986), 1214
- [14] Kubíček V.: *Folia Pharm. Univ. Carol.* 25, (2000), 61-65
- [15] Britton H.T.K., Robinson R.A.: *J. Chem. Soc.* (1931), 1456-1462
- [16] Fernández M.C., Martin V.C.: *Talanta* 24 (1977), 747-748
- [17] web scifinder.cas, <https://scifinder.cas.org>